



**FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

DEPARTAMENTO DE FÍSICA

Microanálise de cálculos urinários por espectrometria de massa de iões secundários

Liliana Teresinho Cangueiro

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador:

Prof. Doutor Orlando Manuel Neves Duarte
Teodoro

Lisboa

2010

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Orlando Teodoro por todo o apoio e conhecimento transmitido. Ao Dr. Alexander Tolstoguzov e ao doutorando Amjad Ghumman pela paciência e disponibilidade, e todo o apoio prestado.

Aos colegas e amigos do laboratório de análise de superfícies pelos desabafos.

Aos colegas e amigos de curso, que me acompanharam durante o percurso académico com todas os seus prazeres e obstáculos, ao longo destes 5 anos. Por ordem alfabética, Andreia Fernandes, Andreia Pimenta, António Jordão, Carla França, Cláudia Silva, Inês Clemente, Joana Almeida, João Morgado, Maria Cardoso, Tiago Araújo, Tiago Vale...

À minha colega de casa Vânia Neves pela amizade demonstrada, e aos amigos de *la tierra*, que mesmo com a distância conseguiram sempre transmitir o seu apoio e carinho.

À minha família, em especial aos meus pais Margarida e José, e ao meu irmão Helder, pelo apoio incondicional ao longo da minha vida, pelo esforço e pelas oportunidades que sempre me proporcionaram.

RESUMO

Os cálculos urinários são uma patologia que afecta cerca de 10% da população mundial. Foram estudados neste trabalho dois dos compostos que ocorrem com mais frequência neste tipo de cálculos, sendo eles a hidroxiapatite e o ácido úrico (ambos sob a forma de pó). No estudo, foram investigados vários modos de preparação destes compostos para análise em ToF-SIMS.

Os métodos de preparação testados foram a deposição do pó sobre uma folha metálica. A deposição era feita comprimindo o pó sobre o metal, ou colocando uma gota de suspensão aquosa do analito. Os metais usados foram o índio, o nióbio e o tântalo.

Verificou-se que é possível estabelecer uma correlação entre as intensidades relativas dos picos característicos dos espectros de massa dos compostos, e propriedades físicas como a função de trabalho, o potencial de ionização e a afinidade electrónica (considerando que estes valores se mantêm constantes e iguais aos dos elementos no estado puro, ou com a mesma relação de proporcionalidade entre si). Desta forma, pode-se ajustar o modo de preparação das amostras, de forma a obter depois espectros que permitam uma melhor análise e interpretação.

ABSTRACT

Urinary calculi are a pathology which affects about 10% of the population worldwide. Hydroxylapatite and uric acid, being typical compounds that occur in kidney stones are considered. In this study, various preparation methods of these compounds (in powder form) were investigated, for the analysis in ToF-SIMS.

The tested preparation methods of the deposition of compounds were in the form of compressed powder or aqueous suspension on a sheet metal. The metals used were indium, niobium and tantalum.

It was found that it is possible to establish a correlation between the relative intensities of the characteristic peaks in the mass spectra of compounds, and the physical properties such as work function, ionization potential or electron affinity (considering that these magnitudes remain constant and equal to those of the pure elements, or at least proportional to them). Therefore, it's possible to adjust the preparation method of the sample in order to obtain spectra with higher sensitivity. The research can be applied to other types of biological samples.

LISTA DE ACRÓNIMOS

ToF-SIMS	Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry
CEFITEC	Centro de Física e Investigação Tecnológica
HAp	Hidroxiapatite
VIH	Vírus da imunodeficiência adquirida
Ox	Oxalato
SIMS	Secondary Ion Mass Spectrometry
TOF	Time-of-Flight
UHV	Ultra High Vacuum

ÍNDICE

Capítulo 1 - Introdução	1
Capítulo 2 – Cálculos Urinários	3
2.1. Génese.....	3
2.2. Composição	4
2.3. Técnicas de análise	6
Capítulo 3 – ToF-SIMS	8
3.1. ToF-SIMS, conceito geral.....	8
3.2. SIMS – Espectrometria de massa de íões secundários	9
3.3. ToF – Tempo de voo	11
3.3.1. Compensação de carga	12
Capítulo 4 - Amostra	14
4.1. Compostos a analisar	15
4.1.1. Hidroxiapatite.....	15
4.1.2. Ácido úrico.....	16
4.2. Substrato	17
4.2.1. Características gerais dos metais	17
4.2.2. Função de trabalho	20
4.2.3. Taxa de pulverização	21
Capítulo 5 – Modo de preparação	25
Capítulo 6 - Resultados.....	28
6.1. Hidroxiapatite.....	30
6.1.1. Espectros de íões positivos	30
6.1.2. Espectros de íões negativos	35
6.2. Ácido úrico.....	39
6.2.1. Espectros de íões positivos	40
6.2.2. Espectros de íões negativos	45
Capítulo 7 - Conclusão.....	49
7.1. Perspectivas Futuras	51
Referências Bibliográficas	52

LISTA DE FIGURAS

Fig. 3.1 Esquema ilustrativo do funcionamento do ToF-SIMS..	8
Fig. 3.2 Ilustração da espectrometria de massa de iões secundários.....	9
Fig. 3.3 Exemplo de um espectro (de um cálculo renal) obtido no modo SSIMS	10
Fig. 3.4 Exemplo de cratera obtida por <i>dynamic</i> SIMS	10
Fig. 3.5 Exemplo de imagem química obtida no ToF-SIMS	11
Fig. 3.6 Ilustração da compensação de energia num espectrómetro do tipo Poschenrieder	12
Fig. 3.7 Desenho ilustrativo do ToF-SIMS com analisador do tipo Poscherieder.	13
Fig. 4.1 Ilustração da hidroxiapatite.....	15
Fig. 4.2 Ilustração do ácido úrico..	16
Fig. 4.3 Espectro de massa de iões positivos do índio.	17
Fig. 4.4 Espectro de massa de iões negativos do índio	18
Fig. 4.5 Espectro de massa de iões positivos do nióbio usado no trabalho.....	18
Fig. 4.6 Espectro de massa de iões negativos do nióbio usado no trabalho.....	19
Fig. 4.7 Espectro de massa de iões positivos do tântalo usado no trabalho.	19
Fig. 4.8 Espectro de massa de iões negativos do tântalo usado no trabalho..	20
Fig. 4.9 Valores das funções de trabalho para os elementos da tabela periódica.....	21
Fig. 5.1 Diagrama das formas de preparação efectuadas.	26
Fig. 5.2 Preparação de amostras de suspensões aquosas.	26
Fig. 5.3 Procedimento para preparação de amostras de pó comprimido.	26
Fig. 6.1 Organização do tratamento de dados	29
Fig. 6.2 Exemplo de um espectro de iões positivos da hidroxiapatite comprimida sobre tântalo.	30
Fig. 6.3 Gráfico do integral do espectro em função do modo de preparação.	32
Fig. 6.4 Espectro de massa da HAp sobre In	32
Fig. 6.5 Espectro de massa da HAp comprimida sobre o Ta	33
Fig. 6.6 Espectro de massa da HAp comprimida sobre Nb	33
Fig. 6.7 Intensidade relativa média dos iões Ca^+ , CaO^+ , CaOH^+ e Ca_2O^+ nos espectros positivos das amostras de hidroxiapatite, para diferentes preparações.	34
Fig. 6.8 Intensidade relativa média dos iões Ca_2O^+ , CaPO_2^+ , Ca^{2+} e $\text{H}(\text{CaO})_2^+$ nos espectros positivos das amostras de hidroxiapatite, para diferentes preparações	34
Fig. 6.9 Exemplo de espectro de massa de iões negativos da hidroxiapatite (suspensão aquosa) sobre tântalo	35
Fig. 6.10 Gráfico do integral do espectro em função do modo de preparação.	36
Fig. 6.11 Espectro de massa de iões negativos da HAp sobre In	37

Fig. 6.12 Espectro de massa de íões negativos da HAp comprimida sobre Ta	37
Fig. 6.13 Espectro de massa de íões negativos da suspensão de HAp sobre Nb	37
Fig. 6.14 Intensidade relativa dos íões P^- , PO^- , PO_2^- e PO_3^- nos espectros negativos das amostras de hidroxiapatite para diferentes preparações.....	38
Fig. 6.15 Ilustração da formação dos íões positivos que resultam da fragmentação da molécula de ácido úrico e que foram estudados.....	39
Fig. 6.16 Ilustração da formação dos íões negativos que resultam da fragmentação da molécula de ácido úrico, e que foram estudados	40
Fig. 6.17 Exemplo de espectro positivo do ácido úrico (pó comprimido sobre nióbio)	41
Fig. 6.18 Histograma do integral do espectro em função do modo de preparação.	42
Fig. 6.19 Espectro de massa de íões negativos do ácido úrico sobre índio.	43
Fig. 6.20 Valor médio das intensidades relativas dos picos, para os diferentes tipos de preparação..	44
Fig. 6.21 Espectro de massa íões negativos do ácido úrico comprimido sobre nióbio.....	45
Fig. 6.22 Espectro massa de íões negativos da suspensão de ácido úrico sobre Ta	45
Fig. 6.23 Espectro de massa de íões negativos de ácido úrico sobre In	46
Fig. 6.24 Gráfico que representa a pulverização total do ácido úrico sobre o nióbio e o tântalo.....	47
Fig. 6.25 Média das intensidades relativas dos íões CN^- e CNO^- para as diferentes preparações....	48
Fig. 6.26 Média das intensidades relativas dos íões $C_5N_4OH_3^-$, $C_5N_4O_2H_3^-$ e $C_5N_4O_3H_3^-$, para as diferentes preparações	48

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Os cálculos renais, formação de pedras no interior dos rins (nefrolitíase) ou dos ureteres (urolitíase), estão universalmente a pôr em risco a saúde humana com uma incidência crescente. Estima-se que em todo o mundo, cerca de 10% das pessoas são afectadas, com um risco acrescido para a faixa etária dos 20 aos 40 anos.

O seu estudo foi sempre um objectivo ao longo da história da Medicina, uma vez que o conhecimento da sua composição permitiria a compreensão da sua formação, que se suponha ser devido a desequilíbrios nos fluidos orgânicos. Contudo, apesar das tentativas, foi apenas no final do século XVIII quando de facto se começou a conhecer a composição dos cálculos. Desde então, ocorreu um desenvolvimento contínuo de técnicas que permitem actualmente um conhecimento exacto da sua composição e estrutura cristalina. Grande parte deste avanço técnico deu-se apenas na segunda metade do século XX.

Estas técnicas desenvolvidas vão desde a análise macroscópica aos vários tipos de espectroscopias, bem como a observação microscópica ou à difracção de raios X.

Tem então todo o interesse o estudo analítico dos cálculos urinários, uma vez que o mesmo proporciona informação acerca da sua possível etiopatogenia, permitindo aos médicos e profissionais de saúde estabelecer estratégias terapêuticas adequadas, bem como providenciar uma informação correcta do diagnóstico do doente e aplicar métodos de profilaxia médica eficazes.

Neste trabalho pretendeu-se avaliar o modo como diferentes tipos de preparação de amostras para análise por espectrometria de massa de iões secundários por tempo de voo (**Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry: ToF-SIMS**) afectam os resultados adquiridos. Estas amostras consistiam em compostos que ocorrem com frequência nos cálculos renais, sendo eles a hidroxiapatite e o ácido úrico. O objectivo consistiu em verificar se o modo de preparação afectava

positiva ou negativamente os espectros obtidos, por forma a eventualmente produzir um método sistemático de preparação de amostras para análise. Para isso, foi ainda necessário aprender a técnica de ToF-SIMS, desde o próprio método de análise aos princípios físicos que a envolvem.

Tinham já sido feitas medições neste tipo de amostras, utilizando como substrato uma folha de índio com pureza elevada (1), no entanto pretende-se agora testar novos metais (Nb e Ta) e formas de deposição do material a analisar, aproveitando as propriedades físicas desta base. Entre estas propriedades destacam-se a função de trabalho, a taxa de pulverização, o 1º potencial de ionização ou a afinidade electrónica.

Para verificar (ou não) as eventuais alterações que estas propriedades físicas induzem nos espectros, foram comparados os espectros em termos de relações entre os picos de massa das diferentes espécies analisadas, bem como o número total de contagens dos espectros obtidos e as intensidades relativas de iões que são a identidade dos espectros da HAp e do ácido úrico, e portanto se se tiver mais contagens num espectro dos iões associados a estes compostos, (em princípio) ter-se-á maior quantidade de informação. Por outro lado, se os picos de determinados iões característicos desses compostos tiverem intensidades, de forma a que a sua identificação seja mais fácil, também mais fácil e sistemática se tornará a análise do cálculo.

O trabalho foi efectuado no laboratório de análise de superfícies do Grupo de Ciências de Superfície e Tecnologia de Vácuo do CEFITEC, que está equipado com um espectrómetro de massa do tipo ToF-SIMS.

CAPÍTULO 2

CÁLCULOS URINÁRIOS

2.1. GÉNESE

Um cálculo renal resulta da formação de pedras no tracto urinário, nomeadamente nos rins (nefrolitíase) e nos ureteres (urolitíase).

A formação dos cálculos é devida a um desajuste nas concentrações dos componentes da urina, nomeadamente saturação dos solutos, retenção de partículas sólidas, bem como agregações sucessivas de cristais e o seu crescimento.

Dietas ricas em legumes como beterraba, cenoura, aipo, tomate, espinafre, ou fruta nomeadamente laranja, framboesa e morango, e bebidas como café, chá e chocolate podem levar à formação de cálculos de oxalato de cálcio. Para cálculos com uratos, a sua causa deve-se a factores genéticos (factor que também entra no caso dos cálculos com oxalato), bem como à ingestão excessiva de carne, peixe, lentilhas e feijões (2).

Esta patologia afecta, de uma forma crescente, cerca de 10% da população mundial com idades compreendidas entre os 20 e os 40 anos. Este risco aumenta para populações que vivam em climas quentes e secos, devido ao risco acrescido de desidratação, como é o caso do Médio Oriente, com uma incidência de cerca de 20-25%. A dieta arábica é também 50% mais baixa em cálcio e 250% mais elevada em oxalatos, aumentando o risco da formação dos cálculos.

Em países ocidentais, dependendo da localização geográfica e do país em questão, a litíase atinge 8% a 19% dos homens, e 3% a 5% das mulheres. As causas para esta doença podem variar. Hábitos alimentares nomeadamente os relacionados com o estilo de vida de pessoas obesas podem constituir um factor de risco.

A epidemiologia da urolitíase difere de acordo com a localização geográfica, a idade e o sexo, bem como a localização e composição do cálculo. Estas diferenças têm a ver com a raça, a dieta

praticada e as condições climáticas. Um factor também interessante de ser observado prende-se com as variações sócio – económicas da população afectada (3).

No início do século XIX, a percentagem de cálculos na bexiga era cerca de 90% (dos casos de cálculos urinários) em países como a China e a Tailândia. Com o passar das décadas, esta frequência diminuiu fortemente. Os países industrializados da América do Norte, Europa e Japão têm aproximadamente apenas 10% de casos de cálculos na bexiga.

Faz portanto todo o sentido investir na investigação da análise dos cálculos renais para poder compreender a sua formação, crescimento e composição e poder evitar ou fazer diminuir a incidência desta patologia na população mundial, promovendo a evolução da ciência, tecnologia e medicina.

2.2. COMPOSIÇÃO

Os cálculos urinários podem ser constituídos por vários tipos de compostos orgânicos e/ou inorgânicos libertados pelo organismo. O estudo da sua composição química é deste modo crucial para a compreensão da etiologia desta patologia, de forma a poder evitar a (re)incidência, bem como complementar as investigações metabólicas dos pacientes. Este estudo pode-se mostrar também útil na identificação de pedras com composições raras e artefactos, ou a precipitação de fármacos no tracto urinário como o triamterene (para o tratamento de hipertensão e edema) e o indinavir (usado no tratamento do vírus VIH) (4).

Até à data, já foram identificados mais de 200 compostos nos cálculos (5). Os mais frequentes encontram-se em seguida listados:

- **Cálculos de Oxalato**
 - Oxalato de cálcio monohidratado ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
 - Oxalato de cálcio dihidratado ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- **Cálculos de Fosfato**
 - Fosfato de cálcio
 - Hidroxiapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$)
 - Carbonatoapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4 \cdot \text{CO}_3\text{OH})_6(\text{OH})_2$)
 - Hidrogenofosfato de cálcio (Monetite) ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
 - Dihidrogenofosfato de cálcio monohidratado ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)

- Fosfato de ácido cálcico dihidratado (*brushite*) ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Fosfato tricálcico (*whitlockite*) ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)
- Fosfato octacálcico ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- Fosfato amónico de magnésio hexahidratado (*estruvite*) ($\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- Fosfato de magnésio trihidratado (*newberite*) ($\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)
- Hidrogenofosfato de potássio (K_2HPO_4)
- **Cálculos úricos $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$**
 - Ácido úrico anidro ($\text{C}_5\text{H}_2\text{O}_3\text{N}_4$)
 - Ácido úrico dihidratado ($\text{C}_5\text{H}_2\text{O}_3\text{N}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
 - Ácido úrico amónico ($\text{NH}_4\text{H} \cdot \text{C}_5\text{H}_2\text{O}_3\text{N}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
 - Urato monosódico ($\text{NaC}_5\text{H}_3\text{O}_3\text{N}_4$)
- **Cálculos de cistina ($(\text{SCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H})_2$)**
- **Cálculos pouco frequentes**
 - Medicamentosos
 - Metabolitos
 - Matéria orgânica
 - Artefactos

Na tabela seguinte encontram-se representadas as frequências de ocorrência dos compostos acima enumerados nos cálculos renais, nalgumas zonas do globo, segundo estudos estatísticos que foram efectuados.

Tabela 2.1 Frequência dos compostos mais comuns nalgumas regiões de diferentes continentes (5)

	Prien USA, 1974	Westbury UK, 1974	Takasaki Japão, 1986	Lancina Espanha, 1997
Oxalato Ca	33,0%	39,4%	16,7%	40,0%
Fosfato Ca	6,0%	13,2%	0,8%	4,0%
Ox + Fos Ca	34,0%	20,2%	63,8%	31,0%
Estruvite	9,0%	15,4%	14,2%	10,0%
Ácido úrico	7,6%	8,0%	3,4%	13,0%
Cistina	0,9%	2,8%	0,8%	1,0%
Outros	1,5%	1,0%	0,2%	1,0%

Em Portugal, notou-se uma diminuição na frequência dos cálculos de fosfato de amónio e magnésio: em 1975 estes representavam cerca de 14% das ocorrências, enquanto que em 2006 ficava-se pelos 4%. O mesmo comportamento ocorre nos cálculos de ácido úrico: 19% em 1975 para 9% em 2006. Significa então que os cálculos compostos por cálcio representam a maioria, sendo que cerca de 7,2% dos habitantes sofre de litíase em Portugal (dados de 2006) (6).

2.3. TÉCNICAS DE ANÁLISE

Os cálculos renais sempre afectaram a espécie humana desde que há memória. No entanto, a sua análise apenas suscitou o interesse em meados do século XVIII, de onde surgem os primeiros relatórios acerca da sua composição química. Hoje em dia são utilizadas diversas técnicas para descrever a composição dos cálculos, desde o simples exame macroscópico aos vários tipos de espectroscopia. Em seguida estão descritas alguns dos métodos de análise mais usados (5):

- **Análise química**
 - No caso da análise química, mais especificamente a *wet chemical analysis*, os iões e as moléculas são facilmente analisados. No entanto, torna-se difícil a diferenciação dos hidratos de oxalato de cálcio (monohidratado ou whewellite, e dihidratado ou weddelite) (2).
 - Trata-se de uma técnica imprecisa, e necessita de grandes quantidades de amostra (7).
- **Espectroscopia no infravermelho (8)**
 - Consiste na medida da absorção da radiação infravermelha por uma substância, em função do comprimento de onda ou da frequência. A forma, intensidade e posição das bandas de absorção do espectro são específicas de uma estrutura determinada, sendo portanto características de uma molécula ou mistura.
 - A espectroscopia no infravermelho foi inicialmente aplicada em química clínica para a análise de biofluidos e amostras biológicas sólidas. No entanto, esta técnica produz frequentemente espectros complexos com contribuições de um número significativo de substâncias desconhecidas, mesmo quando aplicada a material biológico autêntico. A análise destes espectros é facilitada através do uso da quimiometria, que é um termo genérico para a aplicação de sistemas peritos, redes neuronais e outros métodos matemáticos e estatísticos (7).

- Inconvenientes:
 - A diferenciação entre fosfatos é difícil não só devido ao baixo número de picos, como também ao facto destes picos não serem definidos nem significativos na sua zona característica;
 - O aparelho é caro (relativamente aos das outras técnicas aqui enumeradas) e só é utilizável clinicamente para análise dos cálculos;
 - Em alguns casos podem aparecer algumas dificuldades de interpretação, nomeadamente na diferenciação dos oxalatos. Por exemplo, a caracterização do oxalato numa mistura que contenha ácido úrico não é fácil, se a concentração de oxalato for menor que 15%.
- **Difracção de raios X (9)**
 - Adequado para quantificação dos cálculos com componentes minerais, mas não consegue detectar substâncias amorfas, como carbonatoapatite (7).
 - Baixa capacidade para identificar alguns metabolitos ou materiais amorfos, e constituintes presentes em quantidades mais baixas ou mesmo vestigiais.
- **Microscopia electrónica de varrimento (com/sem EDS - *Energy Dispersive Spectroscopy*)**
 - Permite fazer um mapeamento da amostra, no entanto não detecta espécies como o ácido úrico (que só contem elementos leves, H, C, N e O), ou o urato amónico.
- **Análise térmica diferencial**
 - Em termos experimentais, na análise térmica são aquecidas as amostras puras e é verificado o comportamento do seu calor em função da temperatura. Depois efectua-se o mesmo procedimento, mas para o cálculo, e são comparados os perfis de aquecimento das amostras puras e do cálculo (2).

CAPÍTULO 3

TOF-SIMS

3.1. ToF-SIMS, CONCEITO GERAL

A espectrometria de massa de iões secundários por tempo de voo (ToF-SIMS - Time of Flight – Secondary Ion Mass Spectrometry) é uma técnica de espectrometria para analisar a superfície dos materiais. É utilizada uma fonte de iões primários para arrancar partículas que se encontram à superfície de uma amostra a analisar. Estas partículas pulverizadas são as partículas secundárias, que podem ser moléculas ou átomos, bem como iões positivos ou negativos. Entre estas partículas, apenas os iões são acelerados por um campo eléctrico para voarem num espaço livre em direcção ao detector.

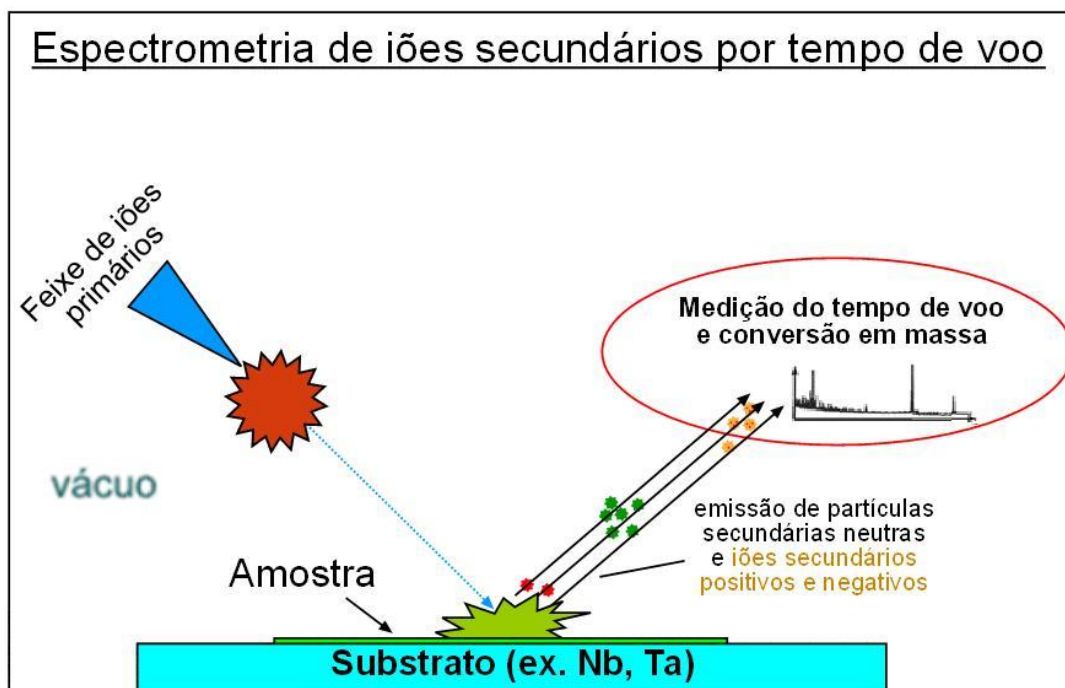


Fig. 3.1 Esquema ilustrativo do funcionamento do ToF-SIMS. Da amostra são pulverizadas partículas com carga eléctrica neutra, positiva ou negativa, mas apenas as não neutras são detectadas e contabilizadas.

O ToF-SIMS produz um espectro de massa positivo e negativo dos 10 – 20 Å mais externos dos materiais, e portanto consegue obter informações detalhadas acerca das características químicas da superfície, fornecendo respostas sobre a natureza, localização e concentração das entidades moleculares presentes (“o que é, onde está, quanto há”) (10).

3.2. SIMS – ESPECTROMETRIA DE MASSA DE IÕES SECUNDÁRIOS

A espectrometria de massa de iões secundários é uma técnica usada na análise de superfícies. Nesta técnica, faz-se incidir na superfície a analisar um feixe de iões ou átomos energéticos, que promove a emissão de partículas da própria superfície devido a reacções em cascata. Por sua vez, estas partículas emitidas (partículas secundárias) serão medidas por um espectrómetro de massa.

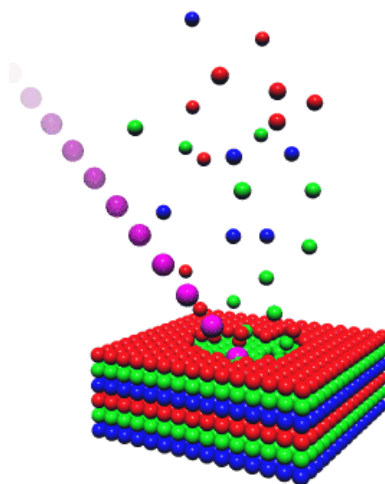


Fig. 3.2 Ilustração da espectrometria de massa de iões secundários. A lilás está representado o feixe de iões primários, e as bolas das restantes cores ilustram as partículas da superfície da amostra

Por definição, o SIMS é um processo destrutivo, maioritariamente usado para obter perfis em profundidade e dados quantitativos acerca dos elementos em quantidades vestigiais na superfície dos materiais.

Pode-se restringir a dose de iões primários para valores abaixo de 10^3 iões \cdot cm², denominado de Static SIMS, SSIMS. Neste modo, apenas uma pequena fracção de aproximadamente 1% da monocamada superior será consumida durante todo o processo de medição, e a aquisição de dados ocorre quase em condições não – destrutivas.

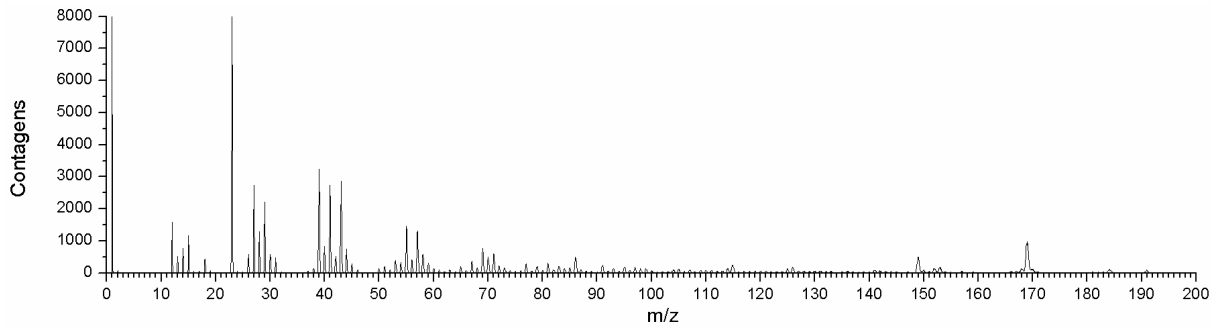


Fig. 3.3 Exemplo de um espectro (de um cálculo renal) obtido no modo SSIMS

Se a corrente do feixe primário for elevada, a quantidade de partículas da superfície é maior, ocorrendo também uma maior erosão da mesma. Nestas condições opera-se em SIMS dinâmico ou *dynamic SIMS* e é possível fazer uma análise em profundidade. Esta análise pode também ser obtida utilizando dois feixes, onde um dos feixes serve para erodir a superfície (por exemplo um feixe de oxigénio), e o outro serve para pulverizar as partículas secundárias a analisar.

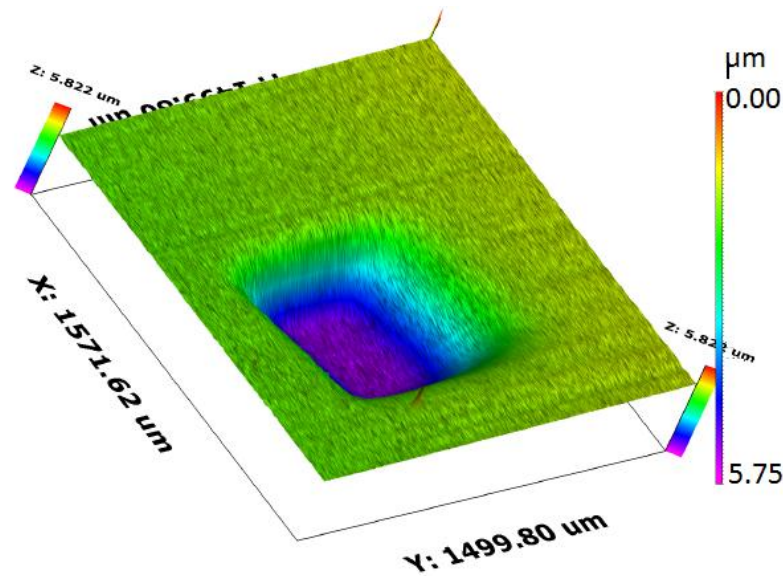


Fig. 3.4 Exemplo de cratera obtida por *dynamic SIMS*

Por outro lado, a composição química de uma amostra pode ser mapeada focando o feixe primário e fazendo-o varrer a superfície da amostra. Assim, obtém-se um espectro de massa completo de cada ponto varrido pelo feixe. Se for usado um metal líquido como o Ga^+ , o feixe primário pode ser focado até 150nm permitindo uma resolução da imagem com o mesmo valor. As medições podem demorar de alguns minutos a algumas horas. Um feixe fino reduz a quantidade de amostra disponível por pixel de imagem, da camada mais externa. Assim, limita-se a quantidade de íões secundários gerados, a sensibilidade e a resolução da imagem. Depois de adquiridos os dados,

pode-se seleccionar o ião específico ou um conjunto de iões e é possível mapear a sua distribuição à superfície (Fig. 3.5).



Fig. 3.5 Exemplo de imagem química obtida no ToF-SIMS (11)

3.3. ToF – TEMPO DE VOO

O ToF separa os iões de acordo com a razão m/z (massa/carga). A massa é determinada de acordo com o tempo que o ião demora a viajar ao longo de um tubo sem campo, de comprimento L , depois de terem sido acelerados num campo de extracção com energia comum $E = eU_a$, sendo e a carga do ião, e U_a o potencial de extracção. A relação entre E e o tempo de voo t é dada por:

$$E = \frac{1}{2}mv^2 = \frac{1}{2}m\frac{L^2}{t^2} = eU_a$$

Uma vez que o tempo de voo é proporcional à raiz quadrada da massa do ião secundário, os iões mais leves viajam a uma velocidade maior e chegam ao detector mais cedo que os iões mais pesados:

$$t = \frac{L}{v} = L\sqrt{\frac{m}{2eU_a}}$$

A melhor separação de iões (ou resolução da massa $m/\Delta m$) ocorre quando a energia dos iões é constante. A fonte primária de iões deve ser pulsada com pulsos de curta duração (da ordem nanossegundo) para ter iões secundários com pouca dispersão no tempo e, conseqüentemente, com pouca dispersão de energia. Depois, uma tensão fixa acelera os iões secundários para o detector, com a sua polaridade dependente do tipo de espectro que se pretende obter (de iões positivos ou negativos). A energia e a dispersão angular dos iões secundários que têm origem durante o processo de emissão podem ser compensadas usando elementos de focagem como um espelho de iões, um reflectrão ou, no caso, um analisador Poschenrieder (12).

O espectrómetro do tipo Poschenrieder usa um analisador electrostático toroidal com um ângulo de deflecção de 164.4° para focar o feixe pulsado e disperso dos iões secundários (Fig. 3.6). A extracção destes iões da amostra ocorre aplicando alta tensão (+ ou -5 kV para iões positivos e negativos, respectivamente) no suporte das amostras. Os iões que são extraídos dispersam ao longo do tubo, de acordo com as suas energias.

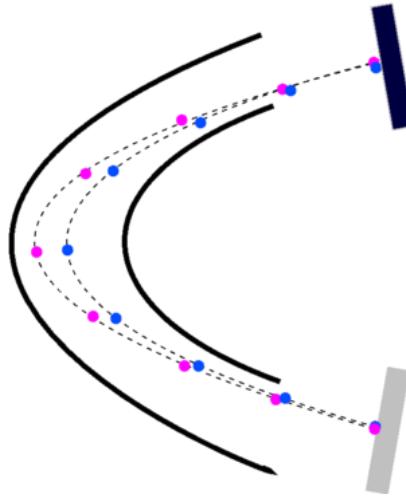


Fig. 3.6 Ilustração da compensação de energia num espectrómetro do tipo Poschenrieder

3.3.1. Compensação de carga

A maior parte dos biomateriais são maus condutores eléctricos ou isolantes, e acumulam carga à superfície durante a análise. Esta acumulação de carga pode reduzir ou eliminar totalmente o sinal dos iões secundários, e ocorre durante o processo de pulverização, devido ao bombardeamento da superfície pelos iões primários carregados positivamente e perda simultânea de electrões secundários. A não ser que a amostra tenha uma condutividade eléctrica suficiente para transportar os electrões até a região pulverizada, esta zona fica com excesso de carga positiva.

Para neutralizar o acumular de carga durante a análise, a superfície é bombardeada com pulsos de electrões de baixa energia entre os pulsos dos iões primários. A corrente e a tensão destes electrões devem ser baixas o suficiente para minimizar a emissão de iões estimulada pelos mesmos (ESIE - *electron-stimulated ion emission*), bem como a danificação da amostra.

Na Fig. 3.7 encontra-se um desenho do ToF-SIMS com analisador do tipo Poschenrieder, com ilustrações do percurso efectuado pelos feixes de iões.

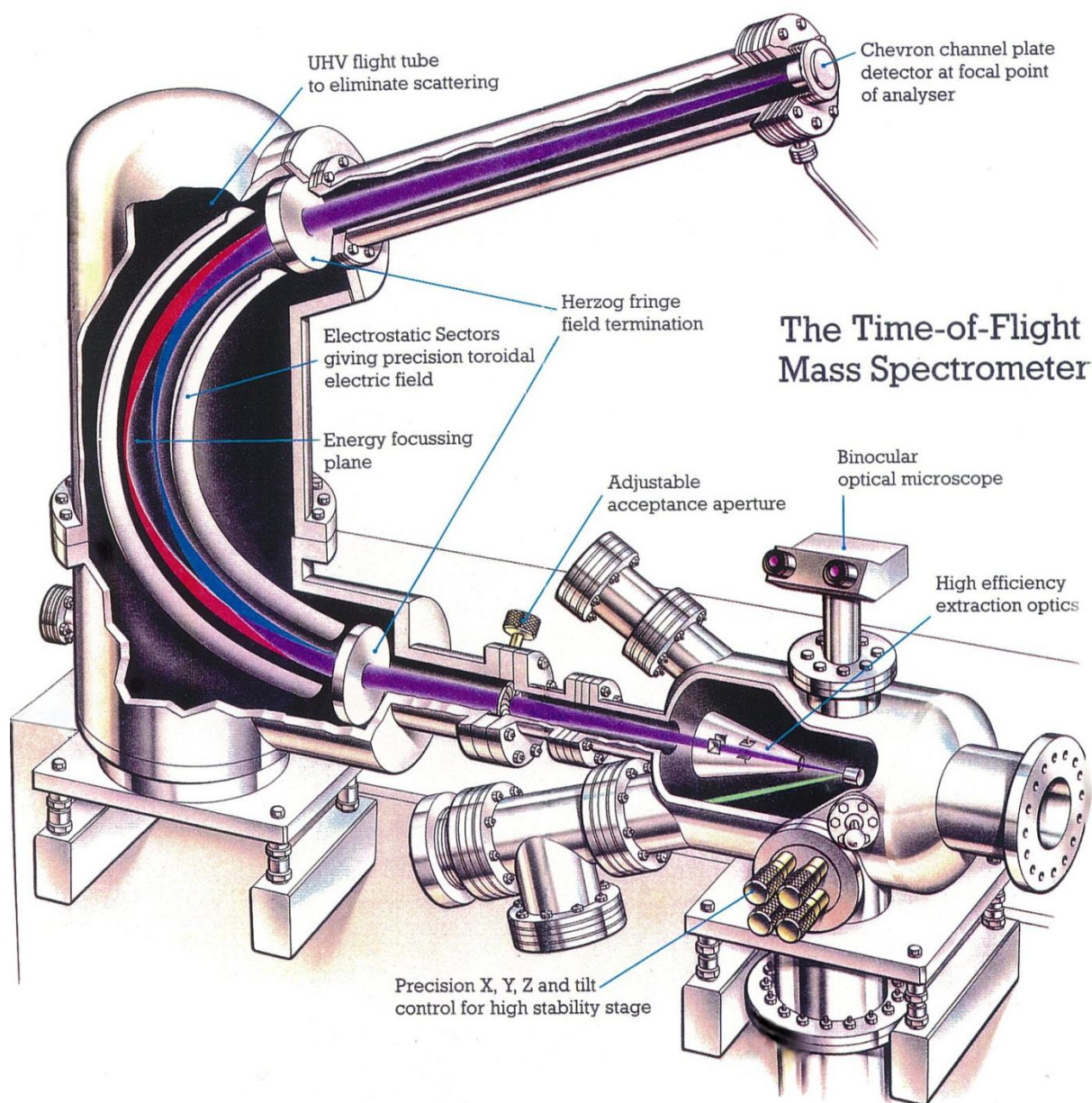


Fig. 3.7 Desenho ilustrativo do ToF-SIMS com analisador do tipo Poscherieder.

CAPÍTULO 4

AMOSTRA

O ToF-SIMS é uma técnica que apresenta vantagens relativamente à quantidade de amostra necessária para análise, comparando por exemplo com outros métodos largamente utilizados no estudo dos cálculos renais como a espectroscopia no infravermelho ou a difracção de raios X. Além disso, os cálculos são compostos sólidos, e portanto passíveis de ser analisados por ToF-SIMS e de se manterem inalterados no ultra alto vácuo, essencial ao sistema, até ao fim da análise. Este nível de vácuo é um requisito porque:

- Assegura que as partículas incidentes viagem da fonte até à amostra, bem como da amostra até ao detector, sem colidirem com outros átomos, iões ou moléculas;
- É requisito para a operação de diversos componentes, como a compensação/neutralização de carga;
- O UHV assegura que não haja contaminação, uma vez que o SIMS detecta espécies presentes mesmo que em concentrações da ordem dos ppm ou ppb.

Por outro lado, esta técnica não necessita que a amostra sofra alguma alteração química para se proceder à análise, nomeadamente a mistura com determinados reagentes que são por vezes essenciais para análises químicas.

É possível analisar amostras sob a forma de pós comprimidos, partículas, filmes finos, ou fibras. Devem também ser analisadas imediatamente após a sua preparação, para evitar reorientações moleculares, difusão da superfície (não muito importante no caso dos cálculos) ou contaminação pelo ambiente do laboratório.

4.1. COMPOSTOS A ANALISAR

4.1.1. Hidroxiapatite

A hidroxiapatite é um mineral formado por vários grupos de átomos e moléculas. A sua massa molecular total (502.3 u) é muito grande no âmbito da análise no ToF-SIMS, e portanto apenas chegarão ao detector do sistema fragmentos deste composto. A sua fórmula molecular é $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, mas por vezes é também escrita como $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, uma vez que a unidade cristalina é formada por duas das estruturas representadas na Fig. 4.1. Esta apatite é constituída por três grupos fosfato (PO_4^{3-}), um grupo hidroxil (OH^-) e 5 átomos de cálcio.

Este mineral ocorre naturalmente e é uma apatite de cálcio, e constitui cerca de 50% dos ossos, além da sua frequência na composição dos cálculos renais.

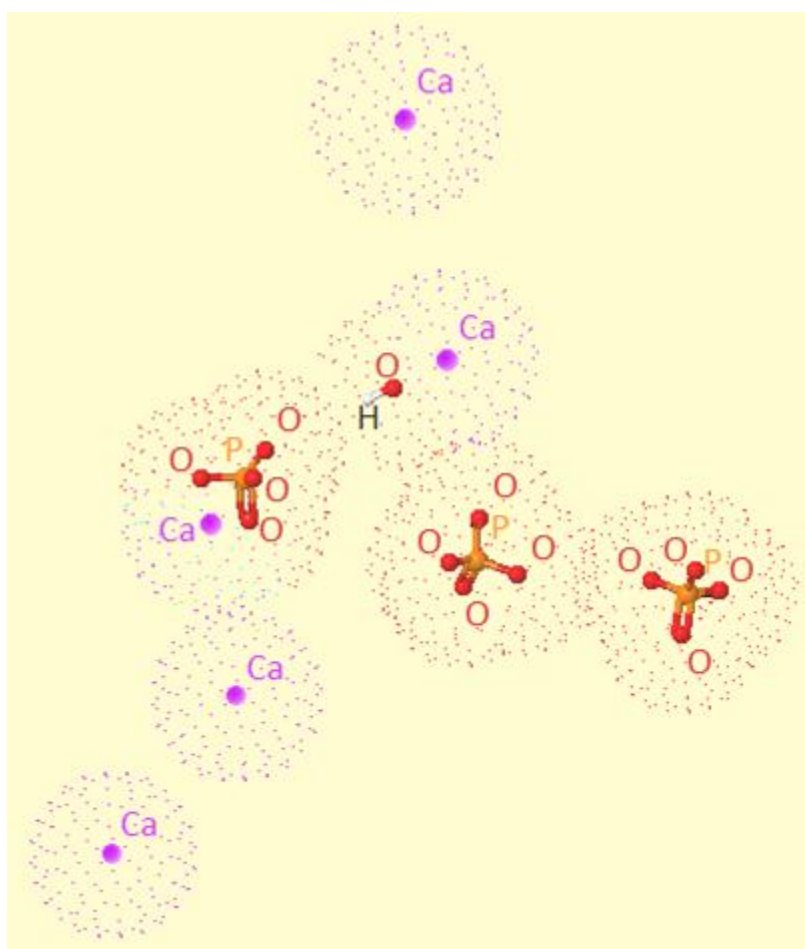


Fig. 4.1 Ilustração da hidroxiapatite ($\text{HCa}_5\text{O}_{13}\text{P}_3$ ou $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$). Trata-se de um mineral constituído por três grupos fosfato associados a 5 átomos de cálcio e a um grupo hidroxil. Por vezes esta apatite é escrita com a fórmula molecular $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ para denotar que a unidade cristalina é formada por duas entidades iguais à representada na imagem.

4.1.2. Ácido úrico

O ácido úrico é um composto heterocíclico, formado apenas por elementos orgânicos unidos por ligações covalentes e com massa molecular de 168 u. É produzido pela enzima xantina oxidase a partir da xantina e hipoxantina, que por sua vez são produzidas pela purina. Nos humanos, cerca de 70% de ácido úrico formado é excretado através dos rins. Existem certas doenças onde a concentração sanguínea deste composto é maior que o normal, levando a diagnósticos como a gota, ou a diabetes. Como consequência, a sua concentração na urina também aumenta, tornando-a hiperconcentrada e insolúvel ao ácido úrico. Este factor promove a formação de cálculos renais constituídos não só pelo próprio ácido úrico, como também por oxalato devido à nucleação heterogénea do cálculo (13).

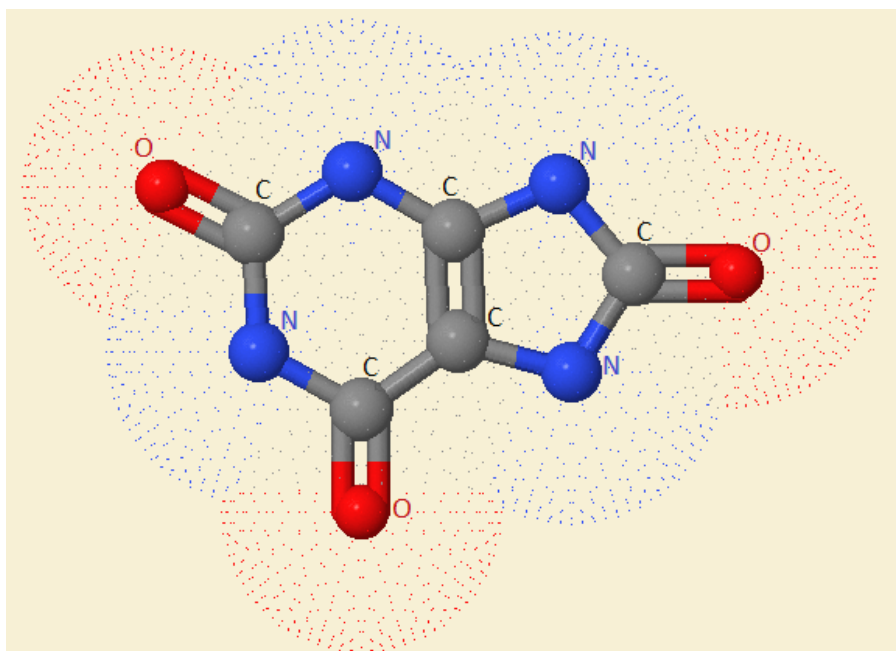


Fig. 4.2 Ilustração do ácido úrico. Este composto é apenas constituído por elementos orgânicos, carbono, azoto, hidrogénio e oxigénio.

O ácido úrico apresenta uma vantagem relativamente à HAp no que diz respeito à sua identificação num espectro de massa adquirido no ToF-SIMS uma vez que se trata de uma molécula mais pequena, o que permite que esta tenha maior probabilidade de não fragmentar aquando do bombardeamento dos íões primários. Desta forma, é possível visualizar nos espectros positivos o pico de massa associado à molécula de ácido úrico protonada (169 u), e nos espectros negativos a molécula desprotonada (167 u).

4.2. SUBSTRATO

As amostras a analisar têm uma condutividade eléctrica baixa. A condutividade eléctrica é um requisito, uma vez que é necessária para permitir a extracção dos íões através do campo eléctrico. Então, para facilitar a análise e obter uma maior taxa de pulverização de partículas secundárias, depositam-se os compostos num substrato condutor, geralmente metálico.

Uma das fases deste trabalho consiste em verificar se a utilização de metais diferentes provoca alguma alteração nos espectros, isto é, se analisando o mesmo composto sobre metais diferentes o resultado obtido será também diferente. Os metais experimentados foram o índio, o nióbio e o tântalo. O índio é dos metais mais usados como substrato nas análises em SIMS (1) (14). Os outros dois foram escolhidos devido a características como o baixo número de isótopos ou a resistência à corrosão e oxidação. O baixo número de isótopos aqui é importante porque simplifica o espectro e facilita a sua interpretação.

4.2.1. Características gerais dos metais

Índio

O índio é um metal com propriedades químicas semelhantes às do gálio ou do alumínio. Tem o número atómico 49 e massa atómica de 114,818 u. Na natureza, o índio consiste em dois isótopos, o ^{113}In (4.3%) e o ^{115}In (95.7%). Como substrato para esta técnica de análise é vantajoso, na medida em que é maleável e dúctil, e portanto adapta-se a qualquer suporte de amostras e facilita a adesão de pós. Além disso, apresenta espectros simples, não complicando a interpretação dos espectros complexos que se pretendem investigar (Fig. 4.3 e Fig. 4.4), e está disponível no mercado com pureza até 5N (99.999%). Tem a desvantagem de não ser reutilizável, uma vez que é difícil remover completamente o analito sem danificar o metal, e é mais caro que o tântalo ou o nióbio.

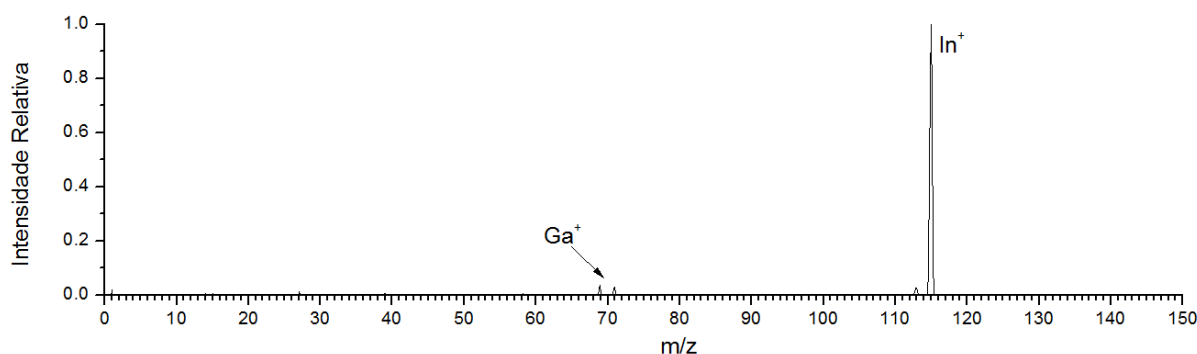


Fig. 4.3 Espectro de massa de íões positivos do índio. Como se pode verificar, a única espécie presente no espectro além do índio é o gálio, associado ao feixe de íões primários. Trata-se portanto de um bom substrato, relativamente à ausência de impurezas e contaminantes.

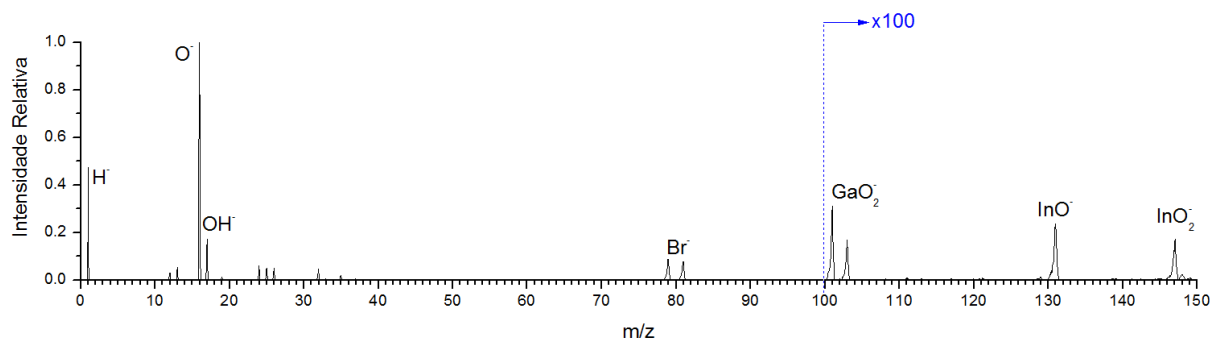


Fig. 4.4 Espectro de massa de íons negativos da superfície do índio utilizado

Nióbio e Tântalo

O níobio é um metal com o número atômico 41 e massa atômica de 92,90638 u. É cinzento, brilhante e dúctil (menos que o índio), e faz parte do grupo dos metais refractários (metais extraordinariamente resistentes ao calor e desgaste). É resistente à corrosão e ocorre naturalmente apenas um isótopo estável, sendo esta uma das vantagens para a análise. O níobio encontra-se como constituinte de minerais como a columbite ou a columbite – tantalite, vulgarmente chamada de coltan (15). Assim, na indústria, o níobio com alta pureza tem como principal contaminante o tântalo. No mercado é difícil encontrar-se com um grau de pureza superior a 99.9%, sendo uma das desvantagens para ser usado como substrato. Além disso é muito mais duro que o índio, e a adesão de pós à sua superfície é mais difícil (bem como a remoção de contaminantes à superfície). Por outro lado, esta dureza confere-lhe resistência, e o metal é completamente reutilizável de análise para análise.

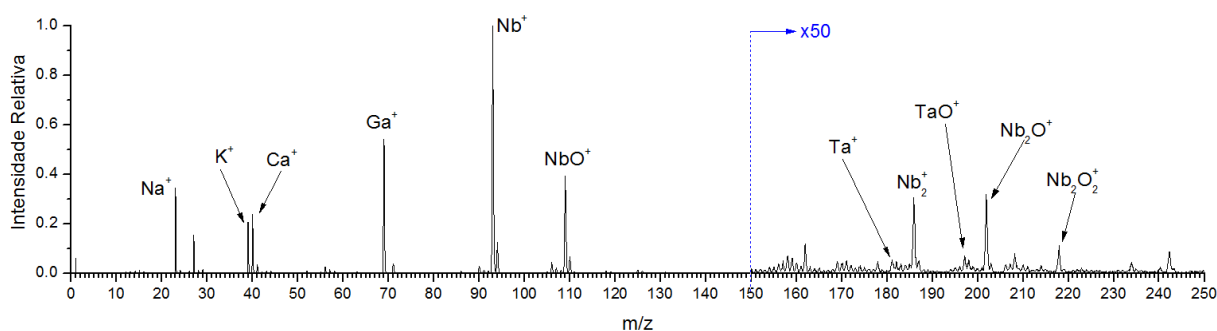


Fig. 4.5 Espectro de massa de íons positivos do níobio usado no trabalho. Ainda que com baixa intensidade, é possível distinguir os picos de íons de tântalo. Os íons de sódio, potássio e cálcio constituem contaminantes que se encontravam na superfície da amostra.

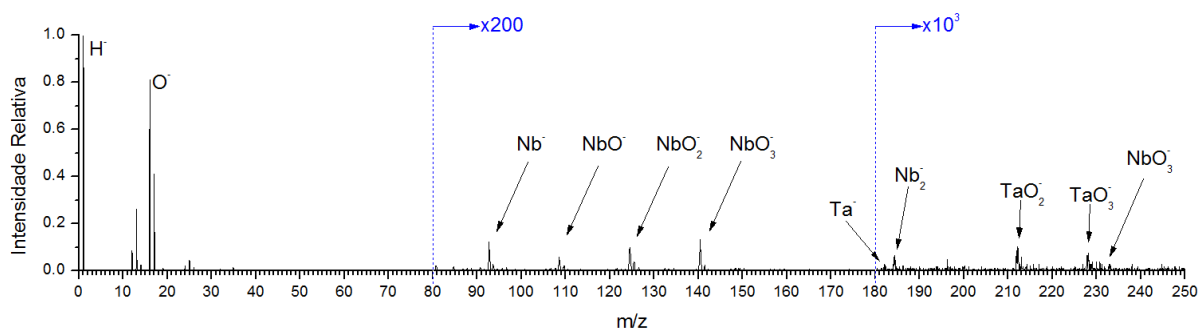


Fig. 4.6 Espectro de massa de íons negativos do nióbio usado no trabalho. Verifica-se facilmente que os íons dos óxidos de tântalo são tão ou mais elevados que os de Nb_2^+ , e é ainda de salientar que os óxidos do nióbio são intensos, visto que o oxigénio é electronegativo, o que pontencia a sua pulverização para os espectros negativos.

O metal tântalo tem o número atómico 73 e massa atómica 180,94788 u. É cinzento/azulado, dúctil e muito bom condutor de electricidade e calor, e tal como o nióbio também é duro. Ocorrem na natureza dois isótopos deste elemento, sendo eles o ^{180m}Ta (0.012%) e o ^{181}Ta (99.988%). O ^{180m}Ta é o único isómero nuclear que ocorre naturalmente e o isótopo mais raro do universo (16). Tem uma baixa taxa de pulverização, tal como o nióbio (Tabela 4.3), e portanto os seus picos no espectro de massa são relativamente baixos (Fig. 4.7 e Fig. 4.8). Como é muito semelhante ao nióbio em termos de dureza e ductilidade, apresenta as mesmas vantagens e desvantagens que já foram referidas para este, no que toca à aplicação em questão.

Nas figuras seguintes encontram-se os espectros de íons positivos e negativos obtidos no ToF-SIMS.

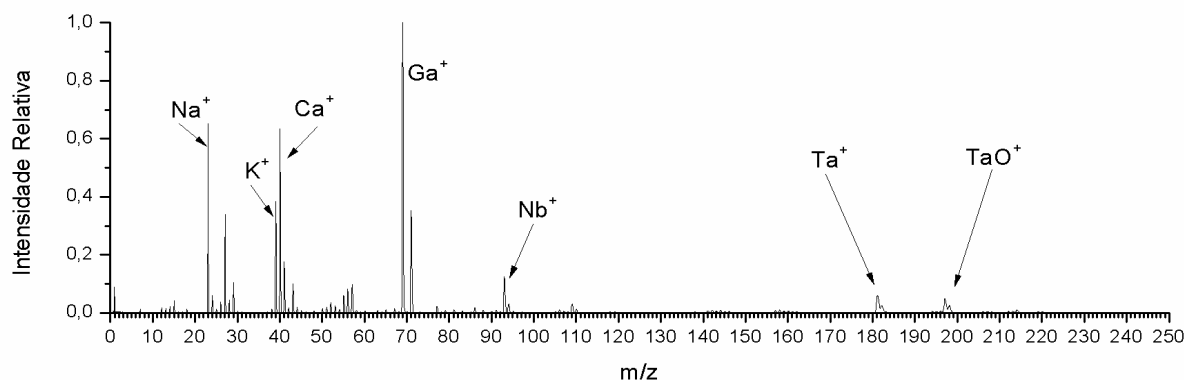


Fig. 4.7 Espectro de massa de íons positivos do tântalo usado no trabalho. O pedaço de folha metálica analisado continha alguns contaminantes, como é possível observar no espectro (Na, K, Ca), bem como gálio que tem origem na fonte de íons primários. Assim como o tântalo é a principal impureza no nióbio de alta pureza existente no mercado, o contrário também acontece, e é aliás visível no espectro.

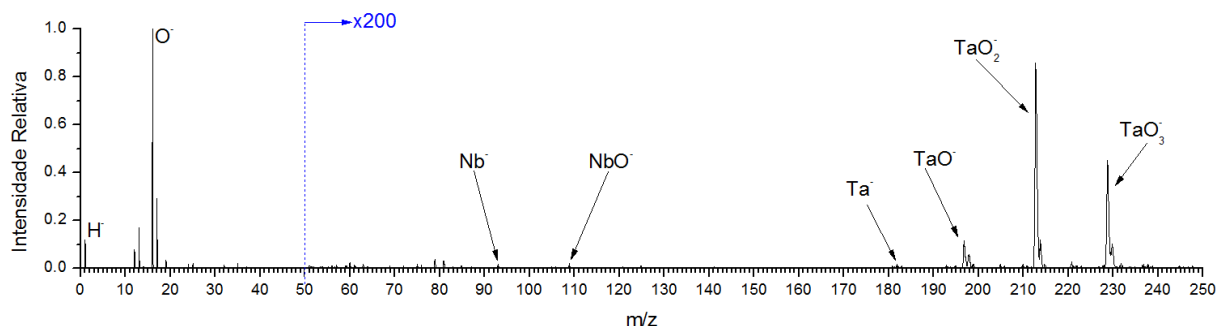


Fig. 4.8 Espectro de massa de iões negativos do tântalo usado no trabalho. Os iões associados ao tântalo têm uma intensidade relativa mais baixa no espectro de iões negativos do que nos positivos (Fig. 4.7). No entanto, neste espectro os óxidos são mais intensos que o ião Ta^- , o que é natural visto que o oxigénio é electronegativo e como tal tem mais probabilidade de ser pulverizado em SIMS. Tal como no espectro de iões positivos, também neste é possível identificar alguns iões contendo nióbio.

O nióbio tem propriedades químicas e físicas semelhantes às do tântalo, e por isso ambos são difíceis de distinguir. O químico inglês Charles Hatchett descobriu um elemento novo parecido ao tântalo em 1801, e chamou-o colómbio. Em 1809 o químico inglês William Hyde Wollaston concluiu erradamente que o tântalo e o colómbio eram idênticos. Por sua vez, o químico alemão Heinrich Rose reportou em 1846 que as minas de tântalo continham um segundo elemento, e chamou-o de nióbio. Em 1864 e 1865, uma série de descobertas científicas esclareceram que o nióbio e o colómbio se tratavam do mesmo elemento (diferente do tântalo), e durante um século ambos os nomes foram usados alternadamente. O nome actual “nióbio” foi oficialmente adoptado em 1949.

Estes dois metais são compatíveis com as condições em que o ToF-SIMS opera, e podem ser produzidos sob a forma de uma folha fina, facilitando neste caso a preparação das amostras.

4.2.2. Função de trabalho

Uma das propriedades a variar é a função de trabalho dos metais usados como substratos das amostras a analisar.

Em física do estado sólido, a função de trabalho ϕ é definida como sendo a energia mínima (normalmente em unidades de electrão-volt, eV) necessária para remover um electrão de um sólido, para um ponto imediatamente a seguir à superfície do mesmo. Aqui, o imediatamente a seguir significa que a posição final do electrão é longe da superfície a uma escala atómica, mas ainda assim muito próximo na escala macroscópica (17).

O valor pode ser estimado para os metais através do efeito fotoeléctrico ou da medida de diferença do potencial de contacto (*contact potential difference*, C.P.D.) V_{AB} que existe entre as superfícies de dois sólidos A e B com funções trabalho ϕ_A e ϕ_B , respectivamente, quando ligados electricamente (17).

Tabela 4.1 Função de trabalho para metais policristalinos (17)

Função de trabalho [eV]		
	Efeito fotoelétrico	C.P.D.
In	4.08	-
Nb	-	4.37
Ta	4.30	4.22

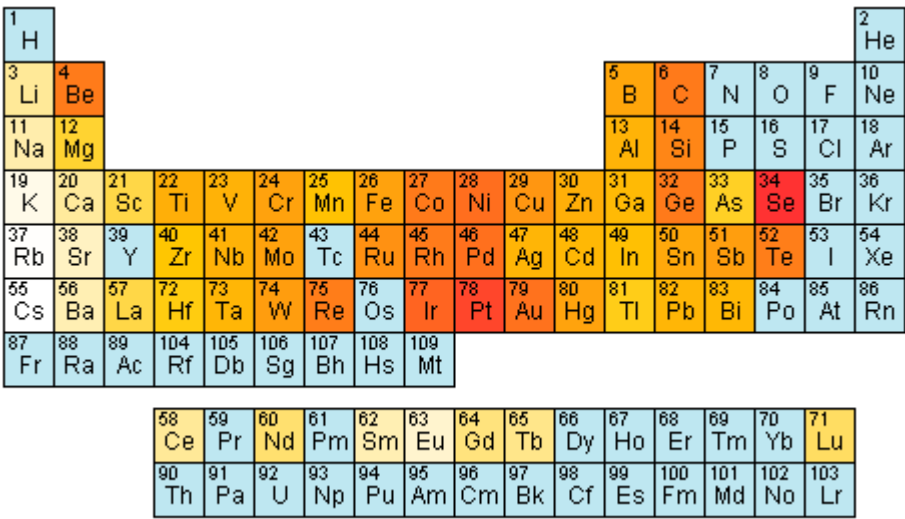


Fig. 4.9 Valores das funções de trabalho para os elementos da tabela periódica. Os elementos a azul não têm um valor definido, os restantes têm um valor segundo a escala de vermelhos (quanto mais escuro, mais elevado) (18).

4.2.3. Taxa de pulverização

A taxa de pulverização tem a ver com o efeito dos iões primários na amostra. Consiste no número de iões secundários produzidos por impacto de um ião primário. É um parâmetro que deve ser tomado em conta, uma vez que quanto maior for esta taxa, mais iões serão extraídos da superfície a analisar, o que por sua vez leva a uma maior quantidade de informação obtida acerca da amostra.

Esta taxa depende não só do material alvo (amostra), mas também de outros parâmetros como a energia do feixe primário e o ângulo de incidência (19). Se se aumentar a massa e a energia cinética dos iões primários, a taxa de pulverização irá obviamente aumentar devido ao aumento de transferência de momento para a superfície da amostra.

A quantificação em SIMS é difícil porque o número de iões secundários formados depende de vários factores, e não é directamente proporcional à sua concentração na amostra. A taxa de pulverização é dada pela seguinte equação:

$$i_{MS} = i_p S R^{\pm} C \eta$$

onde i_{MS} é a corrente dos iões secundários, S é a taxa de pulverização das partículas secundárias por impacto de partícula primária (*sputter yield*), e R^{\pm} é a probabilidade de uma partícula ser emitida como ião positivo ou negativo (probabilidade de ionização). S e R^{\pm} são por vezes agrupados como sendo P , probabilidade de transformação. i_p é o fluxo de partículas primárias, C é a concentração de iões na amostra a analisar e η é a eficiência da transmissão e detecção do sistema de análise (20).

A taxa de pulverização S pode variar de cerca de 0.5 até 5 (valores típicos de acordo com as taxas de pulverização tabeladas). R^{\pm} vai de menos de 10^{-1} até aproximadamente 10^{-6} . A corrente primária i_p varia normalmente de pA ($\sim 10^7$ c/s) até μ A ($\sim 10^{13}$ c/s). Sob as condições mais favoráveis (valores máximos destas quantidades), o membro direito da equação fica $10^{13} \times 5 \times C \times 1$. O membro esquerdo pode tomar no mínimo cerca de 10 c/s. Sendo assim, o valor de C detectado nas piores condições é $10/(5 \times 10^{13}) = 2 \times 10^{-13}$. Na prática, este limite pode ser de $\sim 10^{-6}$ até $\sim 10^{-10}$, ou seja, uma parte por milhão até uma subparte por milhar de milhão. Sendo assim, para ter sinal relativo a um determinado ião que se encontra na superfície da amostra ($\sim 10^{22}$ at/cm³) é necessário que a quantidade desse ião seja de cerca de $10^{-6} \times 10^{22}$ at/cm³ = 10^{16} at/cm³ até 10^{12} at/cm³ (21).

A probabilidade de ionização das partículas depende, entre outros, da função de trabalho e do potencial de ionização (formação de iões positivos) ou da afinidade electrónica (formação de iões negativos) da seguinte forma:

$$R^+ \propto \exp\left(-\frac{I - \Phi}{\alpha^+ \cdot v_{\perp}}\right)$$

$$R^- \propto \exp\left(-\frac{\Phi - A}{\alpha^- \cdot v_{\perp}}\right)$$

onde, para a primeira expressão, I é o potencial de ionização do átomo, Φ é a função de trabalho da superfície, v_{\perp} é a componente perpendicular à superfície da velocidade do átomo e α^+ é uma constante relacionada com o decaimento da função de onda do electrão. Para a segunda expressão, A é a afinidade electrónica do átomo emitido (22). Na tabela seguinte estão alguns potenciais de ionização e afinidades electrónicas.

Tabela 4.2 Potenciais de ionização (23) e afinidades electrónicas (24) de alguns elementos

Elemento	1º Potencial de ionização	Afinidade Electrónica
	(eV)	(eV)
H	13.60	7.5E-01
C	11.26	1.6
N	14.53	7.3E-02
O	13.62	1.5
P	10.49	7.5E-01
Ca	6.11	2.5E-02
Nb	6.77	8.9E-01
Ta	7.88	3.2E-01
In	5.79	3.0E-01

Existem outros factores que podem eventualmente afectar a taxa de pulverização. Podem-se destacar a massa dos átomos da amostra, a orientação e o tipo de organização cristalina (amorfo, policristalino, ou cristal simples). Ainda são de ter em conta a energia de sublimação da amostra e a densidade da corrente primária, que consiste na corrente do feixe dividida pela área de varrimento.

Na tabela seguinte encontram-se alguns valores para a taxa de pulverização dos materiais, em função da energia do feixe e do ângulo de incidência do feixe de iões de gálio.

Tabela 4.3 Taxa de pulverização para o feixe primário de Gálio. Os ângulos e as energias não foram as usadas nas experiências, mas serve para ter uma noção das ordens de grandeza (25).

Elemento	30 keV		5 keV	
	0°	88°	0°	88°
H	0.79	90.78	0.22	36.09
C	1.69	22.93	0.81	9.38
N	2.61	45.43	1.53	15.35
O	4.75	37.00	2.42	17.72
P	2.91	29.10	1.44	9.71
Ca	2.35	14.59	1.68	7.47
Nb	4.18	10.31	3.05	4.25
Ta	7.26	11.45	4.49	3.87
In	13.12	19.30	7.31	8.31

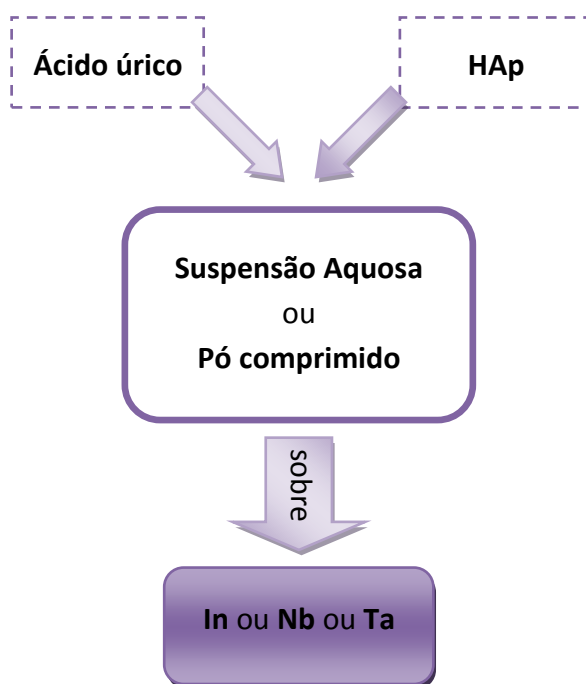
Sendo a taxa de pulverização diferente para cada elemento, não é possível nesta técnica deduzir qual a quantidade exacta de cada componente numa amostra. Tal só pode ser feito apenas por comparação com amostras de referência. A partir da comparação entre espectros de amostras diferentes é possível obter conclusões e ter noção das concentrações dos compostos do que se pretende analisar.

Os valores da Tabela 4.1 e da Tabela 4.2 são referentes aos elementos no estado puro e serão os usados neste trabalho, como aproximação. Considerar-se-ão que estes não se alteram, ou, no mínimo, mantêm as suas relações de proporcionalidade.

CAPÍTULO 5

MODO DE PREPARAÇÃO

As amostras foram preparadas em substratos metálicos diferentes, bem como o estado de aglutinação dos compostos a analisar, hidroxiapatite e ácido úrico (Fig. 5.1). A hidroxiapatite utilizada de origem sintética, e o ácido úrico tinha origem animal. Ambos estavam sob a forma de pó com alta pureza (26) (27).



5.1 Diagrama das formas de preparação efectuadas

Foi recortado um pedaço quadrado de aproximadamente $(1 \times 1)\text{cm}^2$ da folha metálica, com 0.10 mm de espessura. A superfície foi raspada com a lâmina de um bisturi para remover a camada de óxido depositada à superfície da folha, bem como outros contaminantes. Em seguida foram colocadas no metal algumas gotas de suspensão aquosa de cada composto (água pura misturada com o pó), e deixadas secar (Fig. 5.2). A forma mais eficiente de remover a água da suspensão era inserir a amostra em vácuo primário. Quando a água estava totalmente evaporada, encontrava-se à superfície o pó depositado e aderido à mesma, e a amostra era introduzida na câmara para análise.

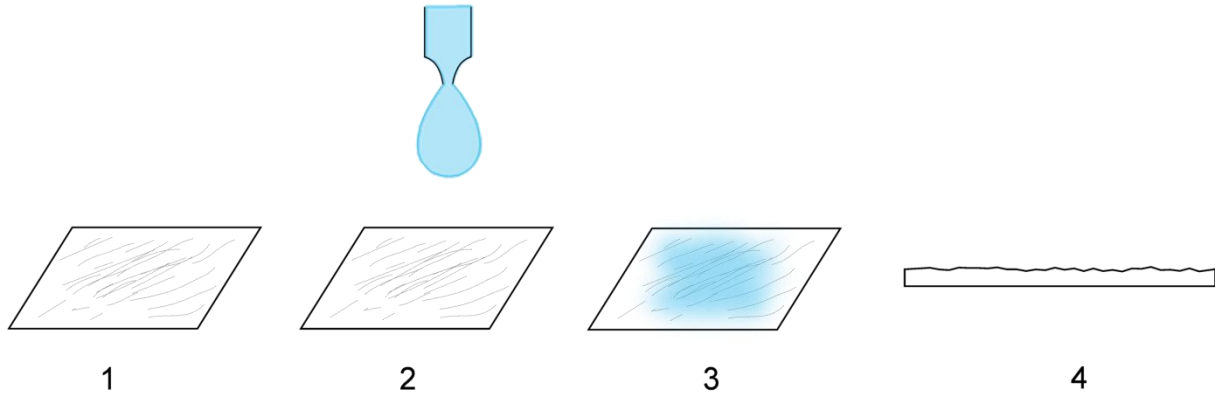


Fig. 5.2 Preparação de amostras de suspensões aquosas. A folha metálica a utilizar pode ser raspada com um bisturi esterilizado para produzir irregularidades na superfície da mesma (1). Depois deposita-se sobre esta uma gota de suspensão aquosa com o pó em suspensão (2 e 3) e insere-se a preparação no vácuo para evaporar a água para que reste só o pó a analisar sobre o substrato metálico (4).

Segundo o fabricante dos compostos utilizados, o ácido úrico é ligeiramente solúvel em água, e a hidroxiapatite é insolúvel. Ainda assim, este método permite que as partículas se depositem sobre o metal de uma forma mais homogênea, e estas podem ainda preencher as rugosidades provocadas pelo bisturi.

Foi também experimentado sobre os substratos a deposição de pó e posterior compressão do mesmo sobre o metal (Fig. 5.3). Teve-se o cuidado de preparar com pouca quantidade de pó, para formar uma camada suficientemente fina, com o propósito de aquando da análise, os iões secundários serem não só de HAp/ácido úrico, mas também da base metálica. Aqui, a camada fina refere-se à escala microscópica. Em termos macroscópicos, trata-se apenas de sujar ou contaminar o substrato com a amostra.

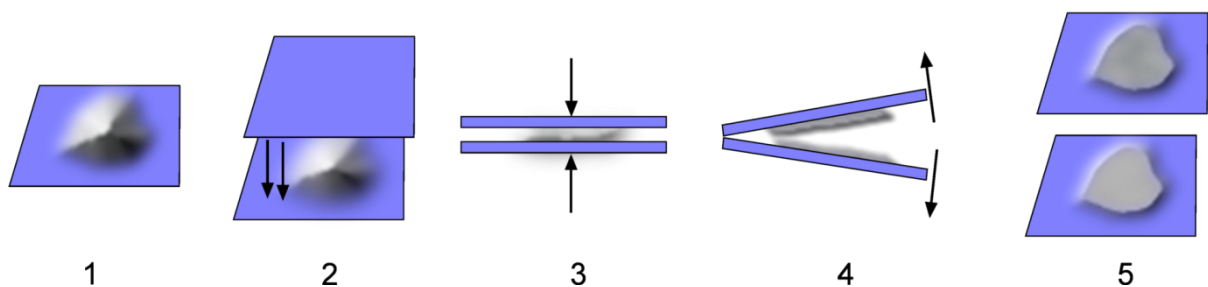


Fig. 5.3 Procedimento para preparação de amostras de pó comprimido. Primeiro deposita-se o pó sobre a folha metálica (1), depois coloca-se a segunda folha do mesmo metal sobre a primeira (2) e comprimem-se ambas preferencialmente numa prensa (3). A seguir separam-se os metais (4), e cada um terá o pó da amostra sobre a sua superfície, obtendo-se assim duas preparações (5).

O facto de ser necessária pouca quantidade de pó para ambas as preparações, e de este ficar espalhado de uma forma mais ou menos uniforme ao longo da folha metálica, e numa camada fina,

constitui uma vantagem para a análise, na medida em que a amostra se mantém condutora eléctrica. Desta forma, durante a aquisição dos espectros não é necessária qualquer compensação de carga.

Uma vez que o ToF-SIMS é uma técnica extremamente sensível, é essencial o uso de luvas e a preparação das amostras num ambiente limpo, de maneira a obter a mínima contaminação possível.

Para ambos os procedimentos verificou-se facilidade no corte e manuseamento dos metais. Os pedaços de folha metálica cortados para a análise têm ainda a vantagem de poder ser reutilizados após a remoção da amostra da superfície, por exemplo utilizando a solução piranha (28).

CAPÍTULO 6

RESULTADOS

Os espectros de iões secundários positivos e negativos foram obtidos com um ToF-SIMS da VG Ionex IX23LS (Burgess Hill, UK) com um espectrómetro *Poschenrieder*. O analisador tem uma resolução de massa de 300 (largura a meia altura), e foi usado um feixe focado e pulsado de gálio como fonte de iões primários. Foi usado um detector de placa de microcanaís Chevron™ 3025MA (Burle, Lancaster, PA, USA). Os sinais aqui produzidos passam depois por um pré-amplificador e vão a um discriminador 4608C (LeCroy, Chestnut Ridge, NY, USA). Os dados são depois adquiridos usando métodos de contagem de pulsos com um conversor analógico – digital TDCx4 (IONWERKS, Houston, TX, USA). Os tempos de voo medidos são transferidos para o computador e obtidos numa interface digital I/O da FishCamp FPCI-DIO-96 (Orcutt, CA, USA), e o tratamento de dados é efectuado na plataforma LabVIEW (National Instruments, Austin, TX, USA).

Analisaram-se amostras com pó comprimido sobre In, Nb e Ta, e amostras com suspensões aquosas sobre Nb e Ta. Apenas foi analisado um tipo de preparação para o índio, porque era este o usado na preparação das amostras, e pretendia-se estudar as vantagens e desvantagens do Nb e Ta.

Os espectros foram adquiridos utilizando uma energia de 14 kV para o feixe primário, e ± 5 kV para os iões secundários (potencial na amostra). A corrente do feixe primário à saída da fonte foi de cerca de 10 μA , e na amostra verificou-se uma redução de 3 ordens de grandeza devido ao processo de focagem do feixe, sendo portanto de aproximadamente 10 nA.

Teve-se o cuidado de, aquando da aquisição, pulverizar zonas da amostra em que fossem visíveis no respectivo espectro picos relativos ao pó em análise, bem como picos referentes ao substrato usado, para maximizar o efeito do último nos resultados.

Os espectros foram obtidos com 15 intervalos por unidade de massa, e utilizando a massa máxima de 500 u. Posteriormente, cada espectro foi integrado de forma a obter uma matriz contendo um valor por unidade de massa/carga. Na integração, usou-se um desvio de 0.5 para o

cálculo dos picos, e um limite máximo de massa de 250 u, suficiente à análise pretendida. Na aquisição usou-se um valor maior para o limite superior de massa para garantir que não aparecia nenhum pico estranho durante a obtenção dos espectros.

Desta forma, foi possível analisar os espectros no programa Deco 1.04, que permite uma decomposição de espectros de massa e identificação de picos, e fornece a contribuição de cada pico (número de contagens total), relativamente ao espectro total tendo em conta os isótopos dos elementos. Neste programa, foram obtidas as quantidades relativas de íões característicos das amostras em cada espectro, e estas quantidades foram depois normalizadas ao integral do mesmo (soma de todos os picos). Estes valores relativos foram posteriormente comparados para verificar a existência ou não de alterações eventualmente provocadas pelo tipo de preparação da amostra (Fig. 6.1). No caso dos espectros de íões positivos do ácido úrico, em vez de ser calculada a intensidade relativamente ao total do número de contagens, foi apenas ao total de contagens dos picos considerados para o estudo.

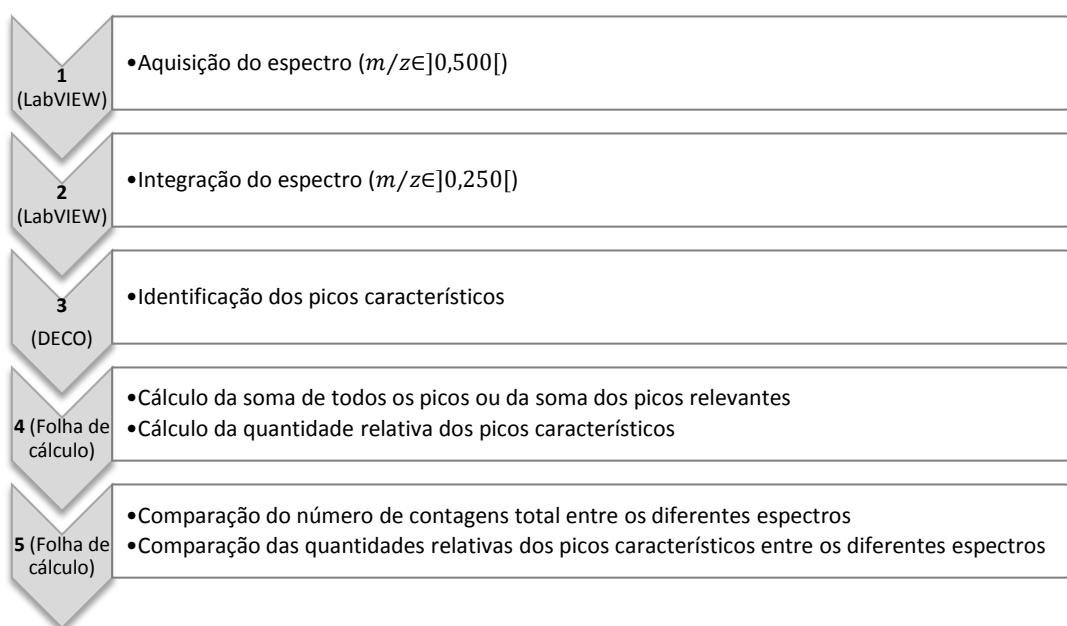


Fig. 6.1 Organização do tratamento de dados

Uma vez que para fazer o estudo comparativo foram calculadas os valores médios, para cada preparação, das intensidades dos picos característicos, bem como das pulverizações totais, calculou-se ainda o erro padrão associado a cada uma destas médias. Este erro vem representado nos histogramas sob a forma de barras de erro. O erro padrão é dado por σ/\sqrt{n} , onde σ é o desvio padrão amostral e n é o número de amostras (neste caso espectros) (29).

6.1. HIDROXIAPATITE

No caso da HAp, foram estudados os picos dos íões de Ca^+ , CaO^+ , CaOH^+ , Ca_2O^+ , CaPO_2^+ , Ca_2^{2+} e $\text{H}(\text{CaO})_2^+$ nos espectros positivos. Nos negativos, foram estudados os íões associados ao fósforo, P^- , PO^- , PO_2^- e PO_3^- . Foram escolhidos estes picos, uma vez que são os que caracterizam a hidroxiapatite. Por exemplo, comparativamente com um espectro de oxalato de cálcio também iriam aparecer alguns destes íões contendo Ca, mas nunca os íões associados ao fósforo.

6.1.1. Espectros de íões positivos

Para adquirir os espectros de íões positivos, foi aplicada uma tensão de +5 kV no suporte da amostra para extrair os íões, e o tempo de aquisição foi de 10 minutos. Os picos mais elevados destes espectros foram os de moléculas contendo cálcio, e o mais elevado de todo o espectro é o correspondente ao Ca^+ . É natural, uma vez que cada molécula de HAp tem 5 átomos de cálcio, que é o elemento mais electropositivo deste mineral. Os restantes átomos, nomeadamente o fósforo e o oxigénio, são electronegativos e com tendência a formar moléculas também com carga negativa, e portanto os picos relativos a compostos sem cálcio são pouco frequentes.

Na figura seguinte está o exemplo dum espectro de uma amostra de hidroxiapatite comprimida sobre a folha de tântalo. É de notar que é possível identificar muitos picos de massa associados à HAp com este método de preparação, sem ser necessária qualquer compensação de carga e apenas com 10 minutos de aquisição.

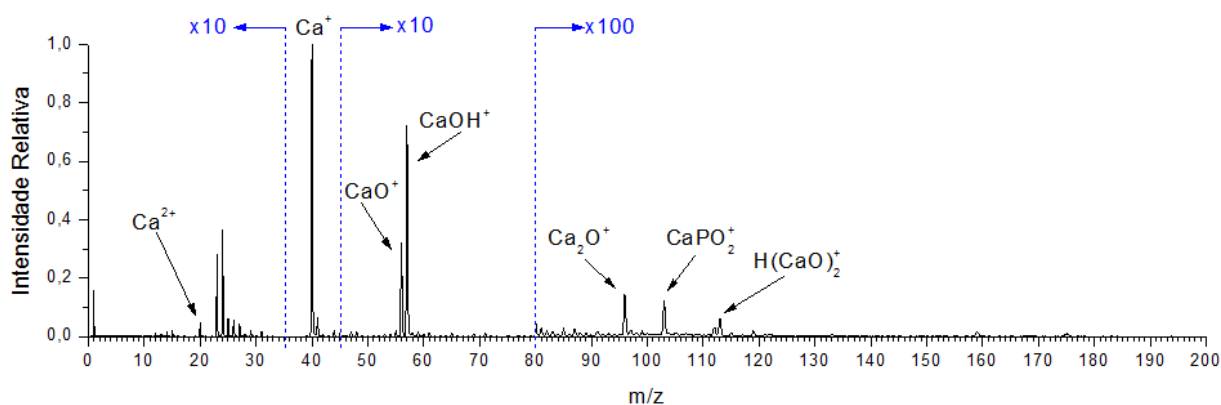


Fig. 6.2 Exemplo de um espectro de íões positivos da hidroxiapatite comprimida sobre tântalo. Os picos mais elevados são os associados ao cálcio.

Caso se façam incidir muitos íões primários sobre uma determinada área da superfície da amostra, quer seja de forma contínua durante pouco tempo ou de forma pulsada durante muito tempo, facilmente se verifica o aumento dos picos dos isótopos do Ga^+ (69 e 71). Tal ocorre porque

os iões ficam implantados na área em causa, e são depois pulverizados pelo feixe primário. É o caso do espectro apresentado na Fig. 6.2, que diz respeito ao quinto espectro (de 10 minutos) adquirido sobre a mesma área de análise.

Foi utilizado para o estudo o seguinte número de espectros por preparação:

Tabela 6.1 Número de espectros por preparação efectuada.

Preparação	Número de espectros
Pó comprimido sobre Nb (i)	6
Pó comprimido sobre Nb (ii)	7
Pó comprimido sobre Ta (i)	7
Pó comprimido sobre Ta (ii)	7
Suspensão aquosa sobre Nb (i)	6
Suspensão aquosa sobre Nb (ii)	7
Suspensão aquosa sobre Ta (i)	6
Suspensão aquosa sobre Ta (ii)	9
Comprimido em In	5

6.1.1.1. Pulverização total

Para avaliar a diferença entre as diferentes preparações, no que toca à pulverização total de iões secundários, foi calculada a soma de todos os picos (de 0 u a 250 u) de cada espectro, que corresponde ao integral do espectro. Este valor é número total de contagens de todos os iões no detector, ao longo dos 10 minutos. Com estes dados foi calculada a média dos integrais correspondentes a cada modo de preparação da amostra.

O comportamento das diferentes amostras relativamente a este integral está representado no gráfico seguinte.

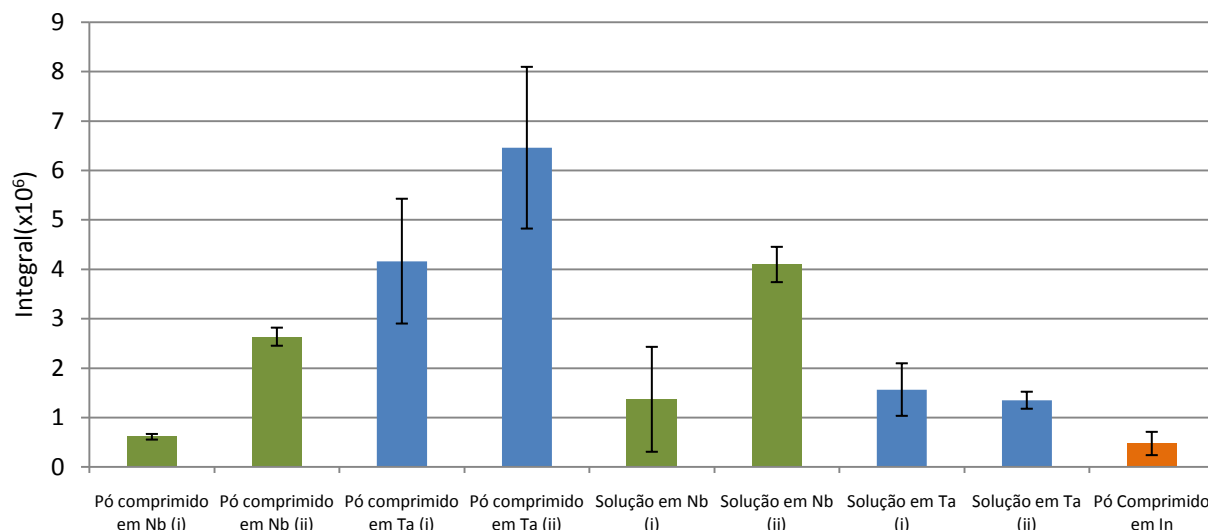


Fig. 6.3 Gráfico do integral do espectro em função do modo de preparação. A verde encontram-se representadas as pulverizações totais das amostras com nióbio, e a azul as de tântalo. A última barra do histograma é da amostra de hidroxiapatite sobre índio

Observando o gráfico da Fig. 6.3, verifica-se que as amostras de pó comprimido sobre o tântalo apresentam maior número de contagens, mas para as suspensões não se pode concluir o mesmo. Por outro lado, para duas amostras com a mesma preparação, a taxa de pulverização pode diferir bastante. Este comportamento observa-se, aliás, em quase todos os tipos de preparações (repetidas) efectuados. O índio tem menos contagens, e o que se verifica nos espectros adquiridos é que o metal é o que contribui mais no espectro de massa (Fig. 6.4), o que se torna contraditório, porque se o substrato está mais exposto, a condutibilidade eléctrica aumenta, e assim deveria também aumentar a pulverização total.

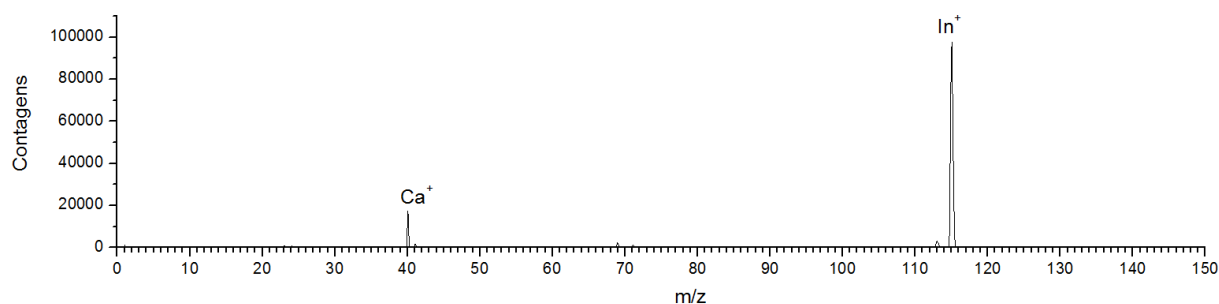


Fig. 6.4 Espectro de massa da HAP sobre In

O que parece ocorrer durante a pulverização das amostras de HAP sobre índio, e cujo resultado figura no espectro da Fig. 6.4, é que a ionização do metal é mais fácil do que dos restantes átomos/moléculas. O potencial de ionização do índio é mais baixo que o do cálcio e além disso a sua função de trabalho é muito maior ($\Phi_{Ca} = 2.87$ eV), e portanto há mais probabilidade ionização do

índio do que do cálcio (ou moléculas contendo cálcio), uma vez que esta probabilidade varia exponencialmente com a função de trabalho e o potencial de ionização (subcapítulo 4.2.3).

Para o tântalo e o nióbio já não acontece o mesmo, porque os potenciais de ionização destes metais são mais elevados que os do cálcio, bem como as funções de trabalho, e portanto a sua probabilidade de ionização é relativamente mais baixa.

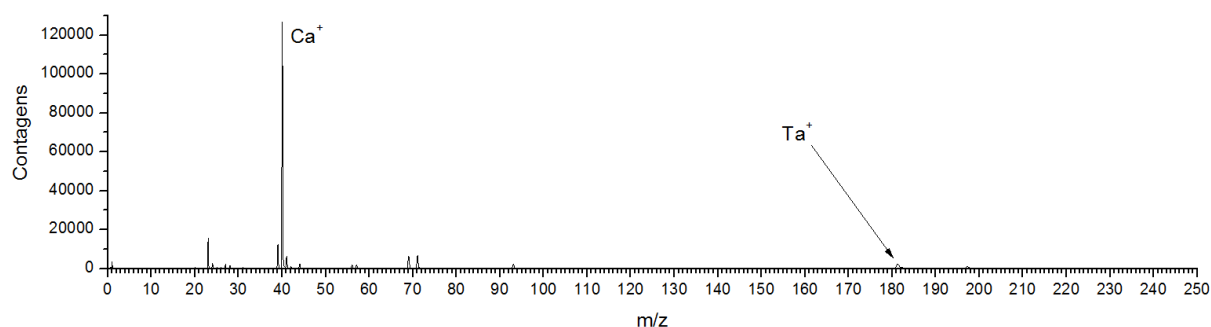


Fig. 6.5 Espectro de massa da HAp comprimida sobre o Ta

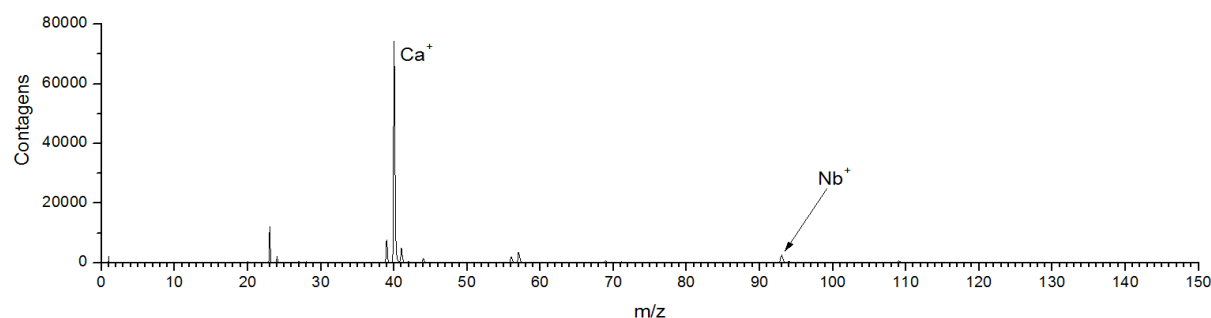


Fig. 6.6 Espectro de massa da HAp comprimida sobre Nb

Como já foi referido, durante a aquisição dos espectros fez-se por pulverizar zonas da amostra em que fosse visível tanto o analito como o substrato, para potenciar o efeito do último. Pode-se confirmar isso com os espectros da Fig. 6.4, da Fig. 6.5 e da Fig. 6.6. No entanto, o que ocorre é que quando o índio está exposto, a pulverização deste aumenta, mas a pulverização da HAp tende a diminuir, e por isso a pulverização total fica mais baixa do que no caso do nióbio e do tântalo. Para estes dois, o material exposto potencia a pulverização de íons do pó, aumentando a informação no espectro de massa.

6.1.1.2. Comparação de picos característicos

Para estudar o efeito que o substrato exerce sobre os picos que caracterizam a hidroxiapatite foram calculadas, para cada espectro, as intensidades relativas dos picos correspondentes aos íons Ca^+ , CaO^+ , CaOH^+ , Ca_2O^+ , CaPO_2^+ , Ca_2^+ e $\text{H}(\text{CaO})_2^+$ no programa Deco. Os valores representados nos gráficos seguintes correspondem à média da intensidade relativa de cada pico para cada

preparação. A intensidade relativa foi calculada dividindo o número de contagens do íon pelo número de contagens total. No entanto, para as amostras com índio, para calcular a quantidade relativa, dividiu-se a intensidade do íon pela intensidade total sem a intensidade do In^+ . Fez-se assim porque se pretende também verificar se se alteram as proporções entre as intensidades dos íons característicos.

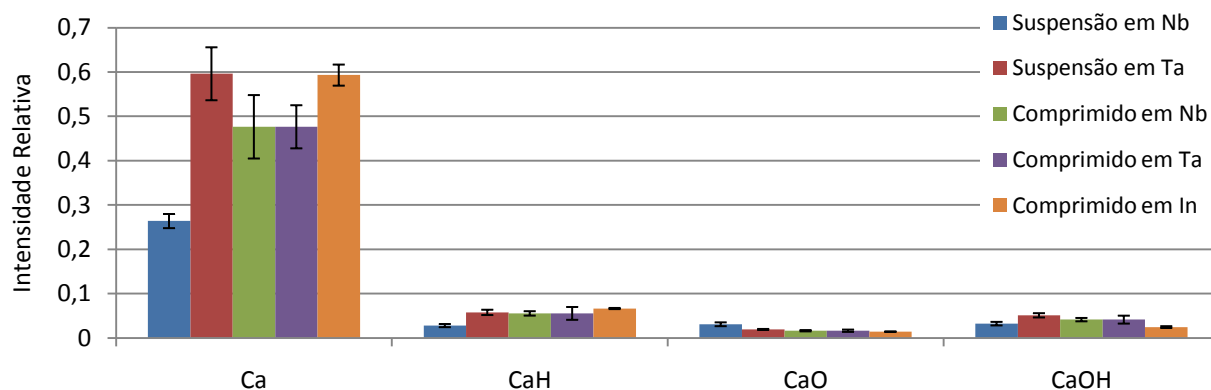


Fig. 6.7 Intensidade relativa média dos íons Ca^+ , CaO^+ , CaOH^+ e Ca_2O^+ nos espectros positivos das amostras de hidroxiapatite, para diferentes preparações.

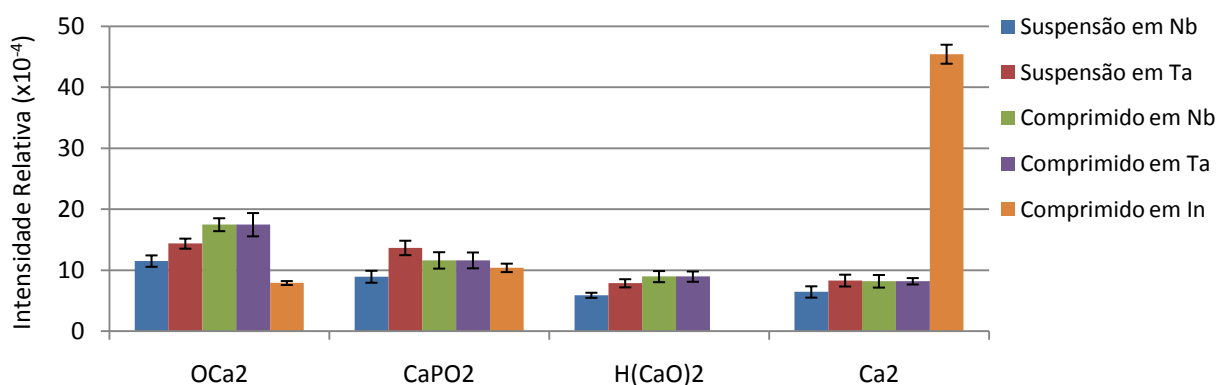


Fig. 6.8 Intensidade relativa média dos íons Ca_2O^+ , CaPO_2^+ , Ca_2^+ e $\text{H}(\text{CaO})_2^+$ nos espectros positivos das amostras de hidroxiapatite, para diferentes preparações. Não foi calculada a média da intensidade relativa do íon $\text{H}(\text{CaO})_2^+$ para as amostras com índio, uma vez que este pico fica sobreposto com o isótopo ^{113}In .

Os gráficos da Fig. 6.7 e da Fig. 6.8 mostram que a ordem de grandeza da intensidade relativa de cada um íons avaliados para o Nb e o Ta é semelhante, pois não existe uma preparação que apresente um comportamento distinto das outras neste sentido. Por outro lado, a amostra com substrato de índio apresenta maior intensidade para o íon Ca^{2+} , e nos restantes íons não tem um comportamento que sobressaia.

6.1.2. Espectros de íões negativos

Para adquirir os espectros de íões negativos, usou-se uma tensão na amostra de -5 kV e um tempo de aquisição de 5 minutos. Os picos mais elevados foram os associados aos elementos oxigénio e fósforo. Na Fig. 6.9 está representado um espectro massa de íões negativos de uma amostra de HAp sobre tântalo.

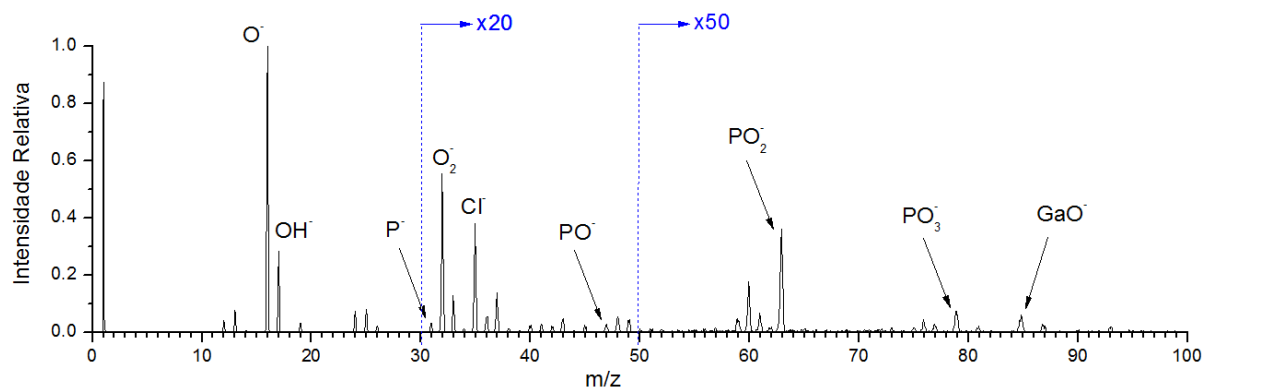


Fig. 6.9 Exemplo de espectro de massa de íões negativos da hidroxiapatite (suspensão aquosa) sobre tântalo

Tal como no caso dos espectros de íões positivos, aqui também se reconhece a implantação do gálio na superfície da amostra, através do aumento da intensidade relativa de GaO^- nos espectros. Os compostos com hidrogénio também vêm a sua intensidade reduzida após o bombardeamento contínuo do feixe primário.

Para a análise dos espectros negativos, foi utilizado o seguinte número de espectros:

Tabela 6.2 Número de espectros por preparação efectuada

Preparação	Número de espectros
Pó comprimido sobre Nb (i)	3
Pó comprimido sobre Nb (ii)	9
Pó comprimido sobre Ta (i)	9
Pó comprimido sobre Ta (ii)	9
Suspensão aquosa sobre Nb (i)	5
Suspensão aquosa sobre Nb (ii)	4
Suspensão aquosa sobre Ta (i)	5
Suspensão aquosa sobre Ta (ii)	5
Suspensão aquosa sobre Ta (iii)	7
Comprimido sobre In	5

6.1.2.1. Pulverização total

Tal como no caso dos espectros positivos, procedeu-se da mesma forma para avaliar a pulverização total dos iões negativos da hidroxiapatite. No gráfico da Fig. 6.10 encontram-se representadas as médias dos integrais dos espectros para cada preparação.

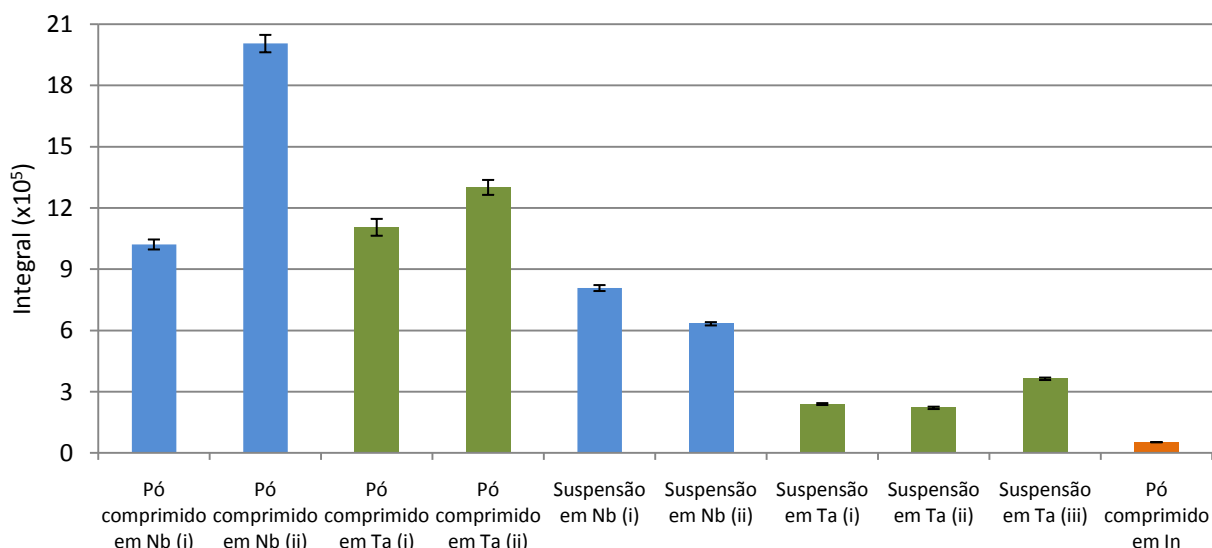


Fig. 6.10 Gráfico do integral do espectro em função do modo de preparação. A azul e a verde estão as amostras cujo substrato é o nióbio e o tântalo, respectivamente. A laranja encontra-se a amostra com índio.

Neste caso dos espectros negativos, verifica-se uma ligeira diferença entre a taxa de pulverização total das amostras de pó comprimido ou de suspensão aquosa (excepto para o índio). Todas as amostras de suspensão aquosa apresentaram (em média) menor número de contagens relativamente às amostras de pó comprimido. A amostra com índio deveria ter apresentado maior número de contagens, uma vez que este elemento tem menor função de trabalho, e portanto maior probabilidade de formação de iões negativos.

Se se compararem os espectros dos diferentes substratos (Fig. 6.11, Fig. 6.12 e Fig. 6.13), verifica-se que a intensidade do oxigénio relativamente às outras espécies é muito maior para a amostra com tântalo. O que acontece é que a afinidade electrónica do tântalo é mais baixa, (relativamente ao nióbio), e a do oxigénio é muito elevada. Como a probabilidade de ionização varia com a exponencial deste valor, o resultado é uma diminuição das intensidades (Tabela 4.2).

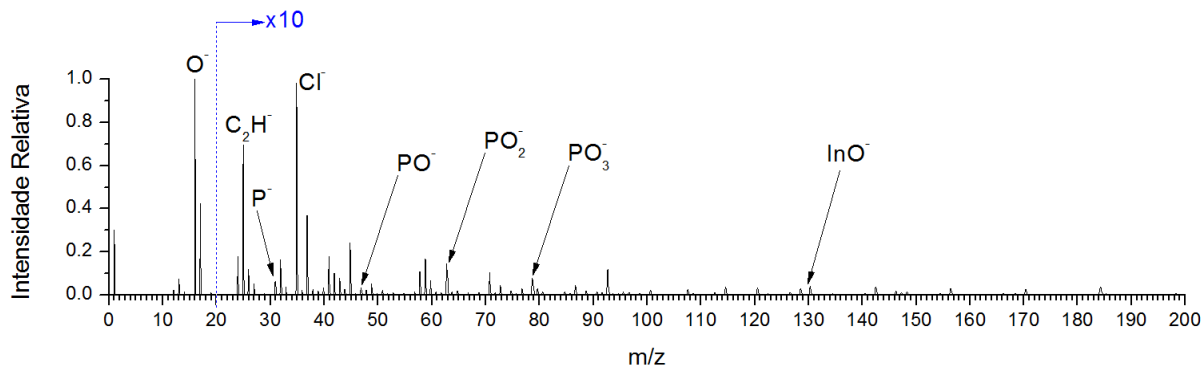


Fig. 6.11 Espectro de massa de íons negativos da HAp sobre In

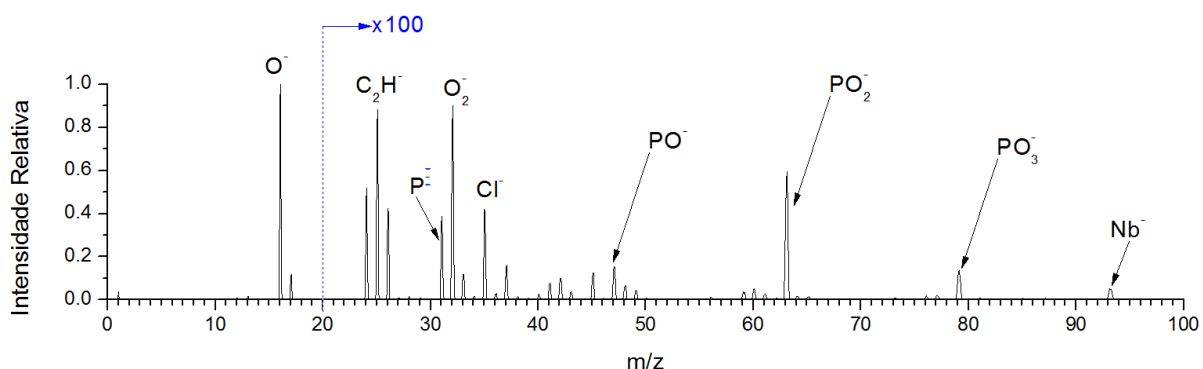


Fig. 6.12 Espectro de massa de íons negativos da HAp comprimida sobre Ta

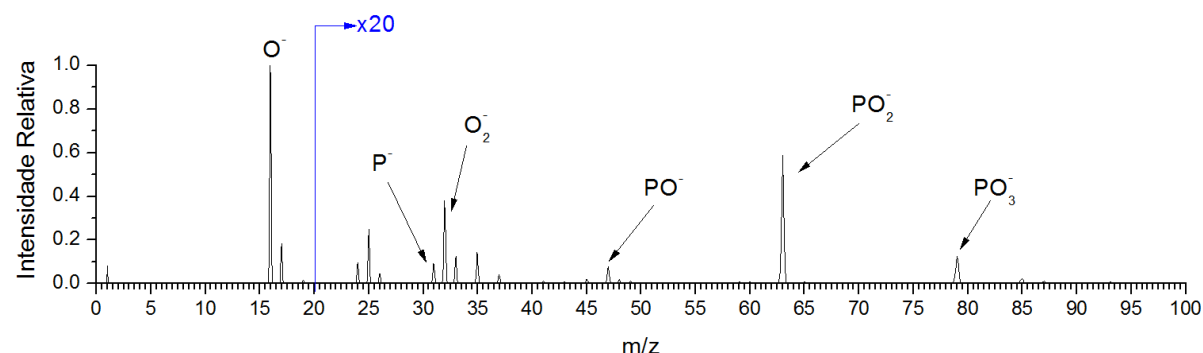


Fig. 6.13 Espectro de massa de íons negativos da suspensão de HAp sobre Nb

O índio tem uma afinidade electrónica próxima da do tântalo, no entanto tinha à superfície contaminantes como o cloro ($A_{Cl} = 3.6$ eV), que é o elemento da tabela periódica com maior afinidade electrónica, o que fez diminuir a ionização do oxigénio (comparando com os espectros dos outros substratos), e aumentar a ionização de outras espécies.

6.1.2.2. Comparação de picos característicos

No que diz respeito a íons negativos característicos da hidroxiapatite, foram analisados os relacionados com o fosfato, P^- , PO^- , PO_2^- e PO_3^- . Tal como para os espectros positivos, foi calculada

aqui a média da intensidade relativa de cada um dos componentes para cada tipo de preparação efectuada. No gráfico seguinte encontra-se representado o resultado deste cálculo.

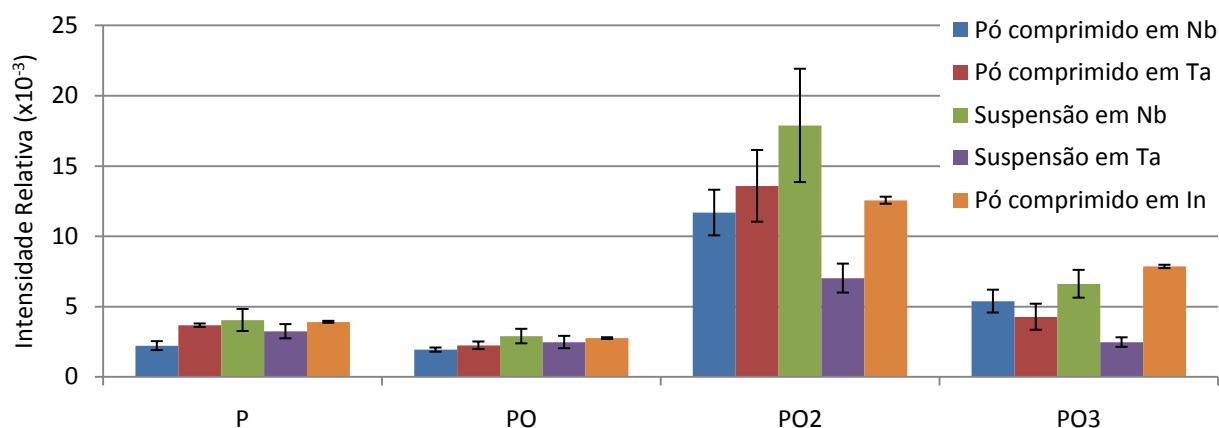


Fig. 6.14 Intensidade relativa dos íões P^- , PO^- , PO_2^- e PO_3^- nos espectros negativos das amostras de hidroxiapatite para diferentes preparações.

Pelo gráfico da Fig. 6.14 verifica-se que as amostras de suspensão aquosa sobre tântalo apresentam intensidades mais baixas, e a razão entre a intensidade do íão PO_2^- e os restantes não é tão grande como nas outras preparações. Podem-se aliás comparar os espectros por exemplo da Fig. 6.13 com o da Fig. 6.9. Este fenómeno provavelmente está relacionado com o modo como as partículas do analito ficam dispostas ao longo da superfície. No caso da suspensão, quando a água evapora, os grãos de pó vão ocupar mais ou menos uniformemente a superfície do metal, aumentando a contribuição deste nos espectros.

6.2. ÁCIDO ÚRICO

Para o ácido úrico foram estudados os catiões HCN^+ , NCOH^+ , NOC_2H_3^+ , $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}_2\text{O}^+$, $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}_2\text{O}^+$ e $(\text{CH})_5\text{N}_4\text{O}_3^+$, e os aniões CN^- , CNO^- , $\text{C}_5\text{N}_4\text{OH}_3^-$, $\text{C}_5\text{N}_4\text{O}_2\text{H}_3^-$ e $\text{C}_5\text{N}_4\text{O}_3\text{H}_3^-$. Os íões $(\text{CH})_5\text{N}_4\text{O}_3^+$ e $\text{C}_5\text{N}_4\text{O}_3\text{H}_3^-$ tratam-se da própria molécula de ácido úrico com um átomo de hidrogénio a mais e a menos, respectivamente. Os restantes íões são fragmentos desta, como se encontra ilustrado na figura seguinte.

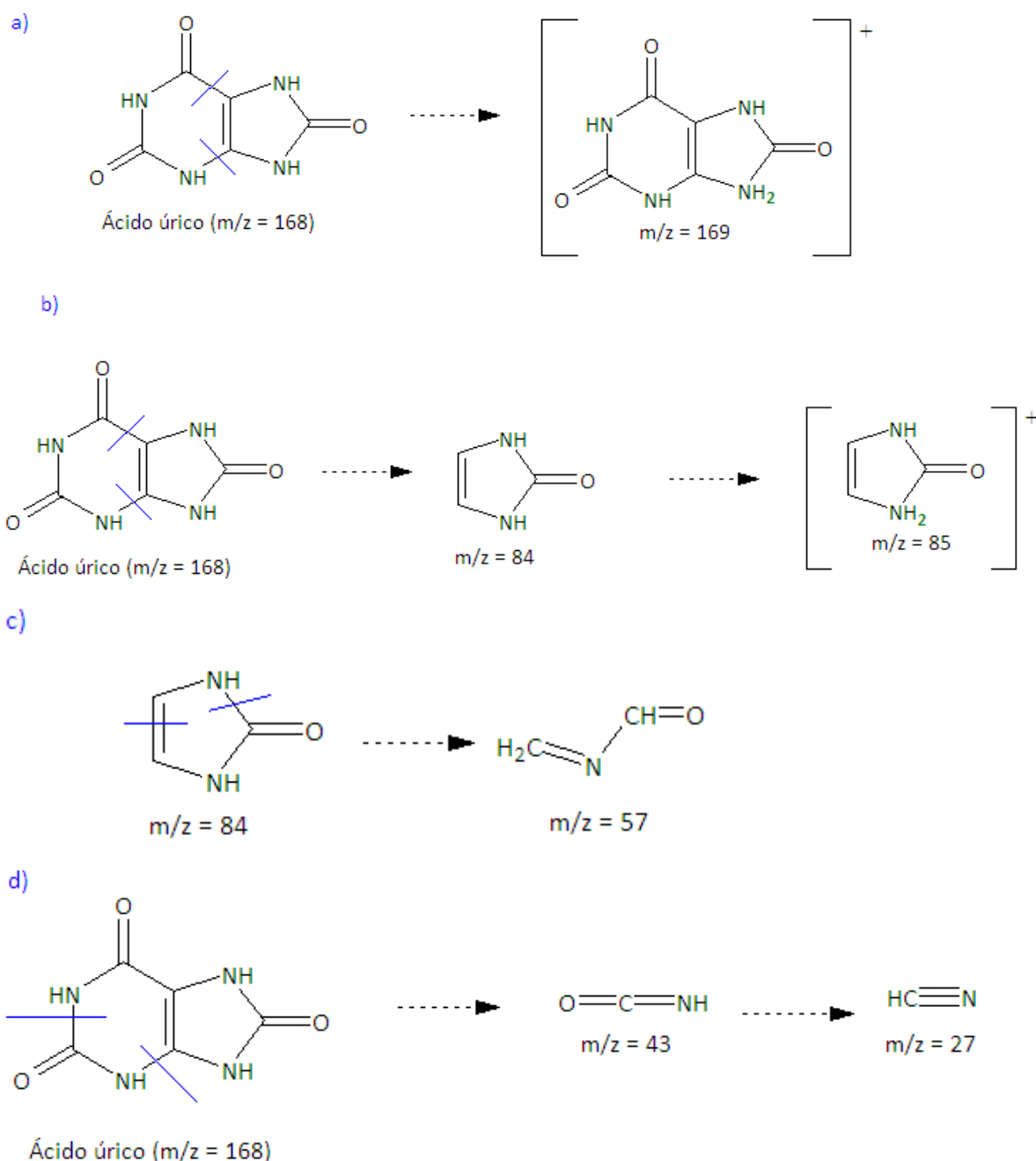


Fig. 6.15 Ilustração da formação dos íões positivos que resultam da fragmentação da molécula de ácido úrico e que foram estudados. Os fragmentos resultam ou da quebra da ligação química (c e d), ou da perda de elementos como o oxigénio (segundo passo de d) ou o ganho de H^+ (a).

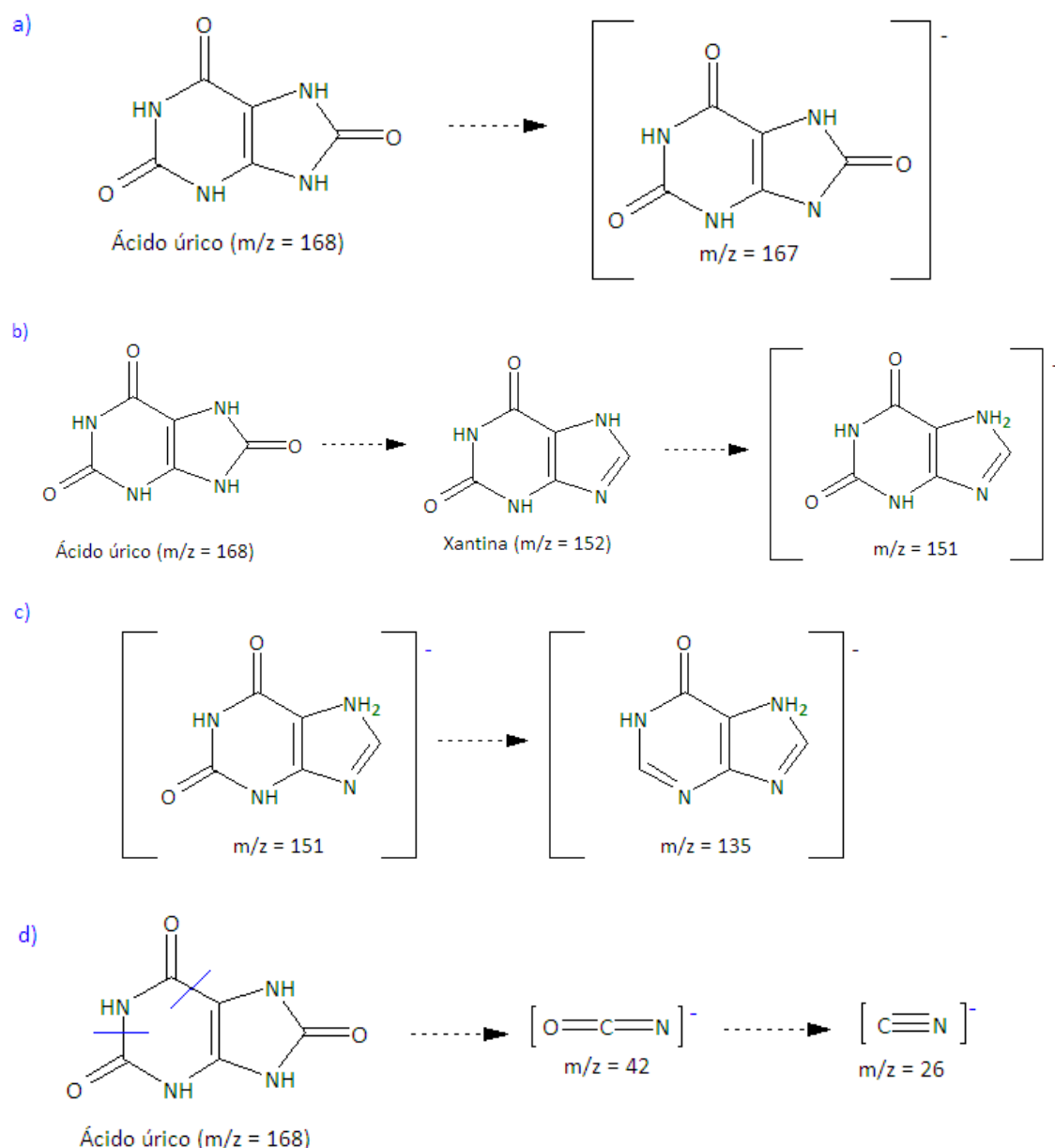


Fig. 6.16 Ilustração da formação dos íões negativos que resultam da fragmentação da molécula de ácido úrico, e que foram estudados. Os fragmentos resultam da perda de prótons (a) ou de átomos de oxigénio (c e d), bem como da quebra de ligações químicas (d).

6.2.1. Espectros de íões positivos

Tal como para a análise da HAp, para a aquisição dos espectros positivos foi aplicada uma tensão de +5 kV, com um tempo de aquisição também de 10 minutos. Tratando-se de um composto orgânico, o espectro resultante consiste num vasto conjunto de picos característicos correspondentes aos vários hidrocarbonetos que são extraídos e/ou fragmentados (Fig. 6.17). Entre estes picos é possível distinguir aqueles que de facto caracterizam a molécula de ácido úrico. Como para HAp, também neste caso se observa que a identificação dos picos característicos do composto é possível sem qualquer compensação de carga e com pouco tempo de aquisição.

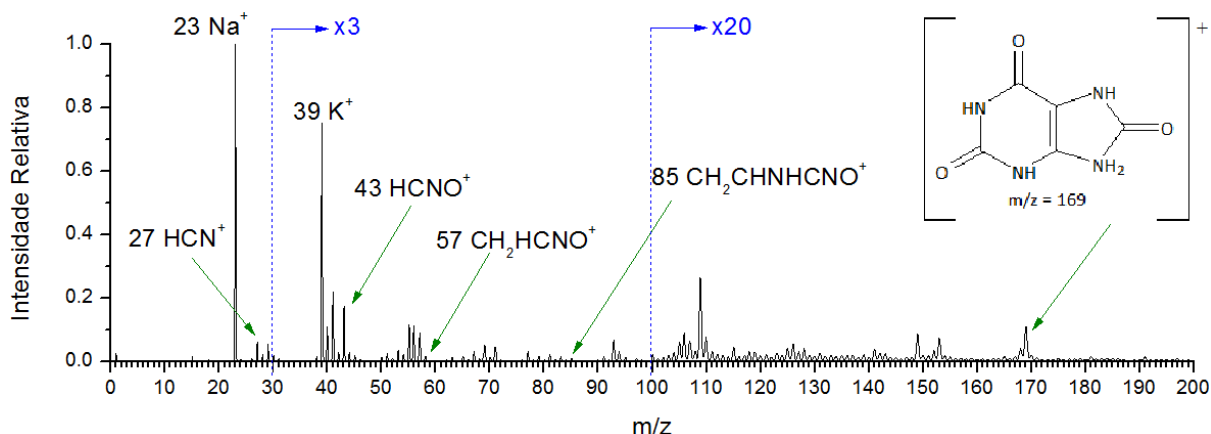


Fig. 6.17 Exemplo de espectro positivo do ácido úrico (pó comprimido sobre nióbio)

Para poder detectar a molécula do ácido úrico não se deve fazer incidir o feixe primário no modo contínuo, porque se trata de uma molécula de tamanho relativamente grande e portanto quebram-se as suas ligações facilmente. Não é portanto recomendável fazer um *sputter cleaning* da amostra antes da análise.

Além disso, durante a preparação verificou-se que a sua adesão ao tântalo ou ao nióbio não é tão forte como no caso da hidroxiapatite, que rapidamente ficava “agarrada” ao metal. A dificuldade acresce ainda devido ao facto de se tratar de um composto orgânico. Na verdade, se os picos característicos do ácido úrico forem pouco intensos, é complicado decifrar se se trata realmente deste composto ou de contaminação da amostra por exemplo de ter tocado com as mãos sem luvas (onde normalmente se transportam impurezas orgânicas). A elevada quantidade de sódio apresentada deve-se à presença deste no pó de ácido úrico utilizado para a análise, com origem no sal de urato monossódico.

Uma outra dificuldade é acrescentada devido aos óxidos dos substratos. O nióbio utilizado apresenta normalmente à superfície NbO , NbO_2 e NbO_3 (com massas moleculares de 109, 125 e 141, respectivamente). Os picos associados a estes óxidos aparecem nos espectros, mesmo depois de o metal ter sido limpo mecanicamente com uma lâmina. Por sua vez, o ácido úrico tem picos característicos em m/z de 124 e 140 para os iões negativos, e 126 e 142 para os iões positivos. Sendo assim, estes picos acabam por ficar sobrepostos aos dos óxidos associados aos substratos utilizados (incluindo o tântalo, uma vez que tem o nióbio como principal contaminante). De qualquer maneira, o ácido úrico é uma molécula orgânica que numa análise deste tipo produz vários fragmentos além destes dois, e portanto com um estudo atento dos seus espectros é possível identificá-lo na mesma.

Para este estudo utilizou-se o seguinte número de espectros por preparação:

Tabela 6.3 Número de espectros analisados por tipo de preparação

Preparação	Número de espectros
Pó comprimido sobre Nb (i)	9
Pó comprimido sobre Nb (ii)	6
Pó comprimido sobre Ta (i)	8
Pó comprimido sobre Ta (ii)	8
Suspensão aquosa sobre Nb (i)	6
Suspensão aquosa sobre Nb (ii)	4
Suspensão aquosa sobre Ta (i)	8
Suspensão aquosa sobre Ta (ii)	9
Pó comprimido em In	4

6.2.1.1. Pulverização total

Foi calculada a soma de todos os picos de cada espectro obtido (de 0 u a 250 u), com o objectivo de avaliar a diferença da pulverização total entre cada tipo de preparação. No gráfico seguinte está representado o comportamento das diferentes amostras relativamente à pulverização.

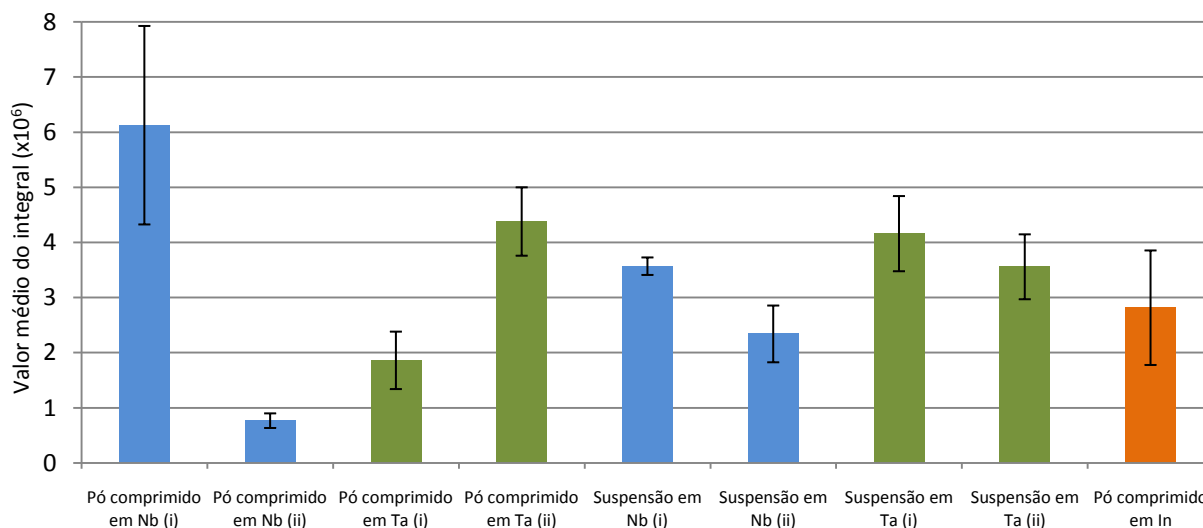


Fig. 6.18 Histograma do integral do espectro em função do modo de preparação. A verde encontra-se o número de contagens da amostra sobre o substrato de tântalo, e a azul as amostras cujo substrato é o nióbio. A laranja encontra a pulverização total medida da amostra com índio.

Observando o gráfico da Fig. 6.18, não se verificou aqui uma relação causa – efeito no que toca à influência da preparação na pulverização total em cada aquisição. As causas aparentes para estas variações no número total de contagens situam-se em princípio na área da amostra bombardeada pelo feixe primário (se o metal está muito exposto ou não), e não no método de preparação. Exemplo disso são as duas primeiras amostras representadas no gráfico da Fig. 6.18, cujo método de preparação é o mesmo, e o número total de contagens é muito diferente (comparativamente com as restantes amostras). De qualquer maneira, a ordem de grandeza da pulverização total é a mesma para todas as amostras estudadas. O índio tem a função de trabalho mais baixa dos três metais, e por isso deveria ter apresentado o menor número de contagens. Sendo assim, obtiveram-se, tanto para o índio como para os outros, pulverizações totais que não vão de encontro com os valores da função de trabalho descritos na literatura.

Por outro lado, na análise do ácido úrico sobre o índio, não se verifica uma intensidade do pico de massa característico do índio tão elevada, como ocorria para a HAp, como se pode verificar no espectro da Fig. 6.19. Isto deve-se ao facto de o 1º potencial de ionização do sódio (que é o principal contaminante do ácido úrico utilizado para a análise) ser mais baixo do que o do índio ($I_{Na} = 5.1 \text{ eV}$), apesar função de trabalho ser mais baixa ($\Phi_{Na} = 2.36 \text{ eV}$).

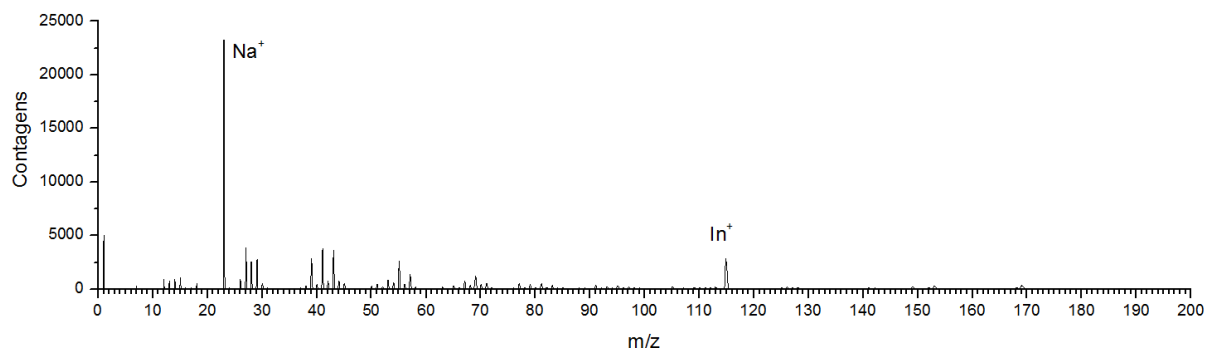


Fig. 6.19 Espectro de massa de íões negativos do ácido úrico sobre índio. O fenómeno que ocorre nos espectros análogos para a HAp, onde se verifica uma intensidade muito elevada do In^+ , não ocorre aqui.

6.2.1.2. Comparação de picos característicos

Com o intuito de estudar o efeito da preparação sobre os espectros do ácido úrico, calcularam-se as intensidades relativas dos picos dos íões HCN^+ , NCOH^+ , NOC_2H_3^+ , $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}_2\text{O}^+$, $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}_2\text{O}^+$ e $(\text{CH})_5\text{N}_4\text{O}_3^+$. Neste caso, as intensidades são relativas à soma das intensidades totais destes 6 íões, e não aos picos do espectro todo. Procedeu-se desta forma porque, tratando-se de um composto orgânico, existe um grande número de fragmentos de hidrocarbonetos que se formam com a quebra das ligações do ácido úrico. A intensidade destes fragmentos varia de espectro para

espectro, e portanto se se quisessem comparar as intensidades dos íões referidos, ia-se sempre entrar com estas variações, obtendo-se resultados menos perceptíveis.

Com estas intensidades relativas calculou-se o seu valor médio em cada preparação (como no caso da HAp). O resultado encontra-se representado na Fig. 6.20.

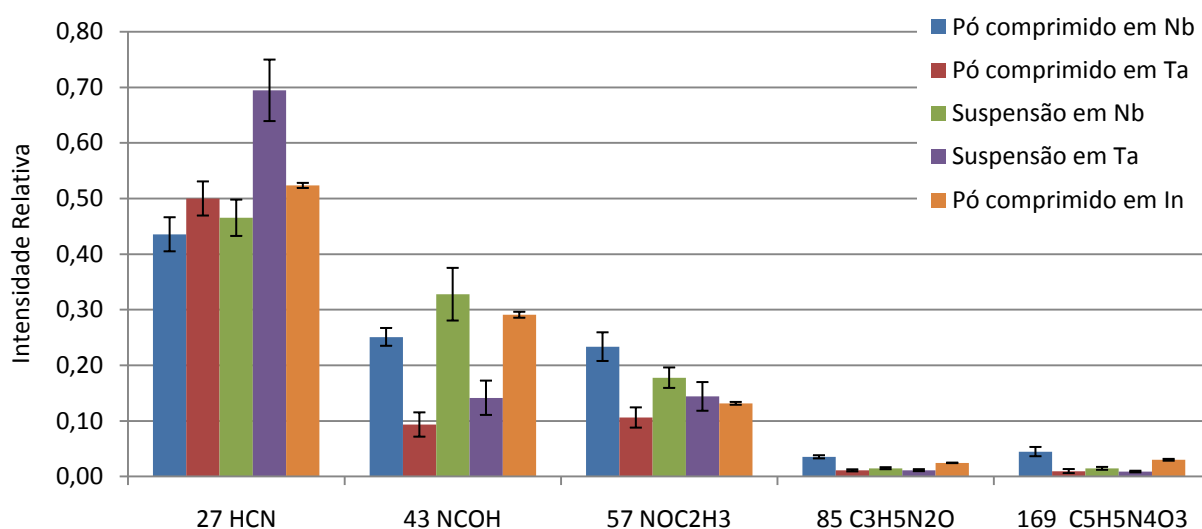


Fig. 6.20 Valor médio das intensidades relativas dos picos, para os diferentes tipos de preparação.

Através da observação do gráfico da Fig. 6.20, verifica-se que as quantidades relativas dos diferentes fragmentos não apresentam valores que caracterizem o tipo de preparação efectuada, e a ordem de grandeza das intensidades de cada íão é a mesma para as diferentes amostras. Apenas há a referir que para as amostras de tântalo, a intensidade relativa dos íões (à excepção do HCN^+) foi mais baixa. Provavelmente houve uma maior fragmentação das moléculas, uma vez que estas amostras apresentam intensidades altas para o íão mais pequeno, HCN^+ . Para as restantes amostras, o comportamento das quantidades relativas dos íões foi semelhante.

6.2.2. Espectros de íões negativos

Para adquirir os espectros de íões negativos do ácido úrico foram utilizados 5 minutos, tal como no caso da hidroxiapatite, bem como -5 kV para a aceleração dos íões secundários. Os picos que sobressaem mais são o oxigénio, o cianeto e o cianato, e depois com massas moleculares mais elevadas é possível observar os fragmentos associados à molécula de ácido úrico (135, 151, 159, 161, 165, 167, ...) (Fig. 6.21).

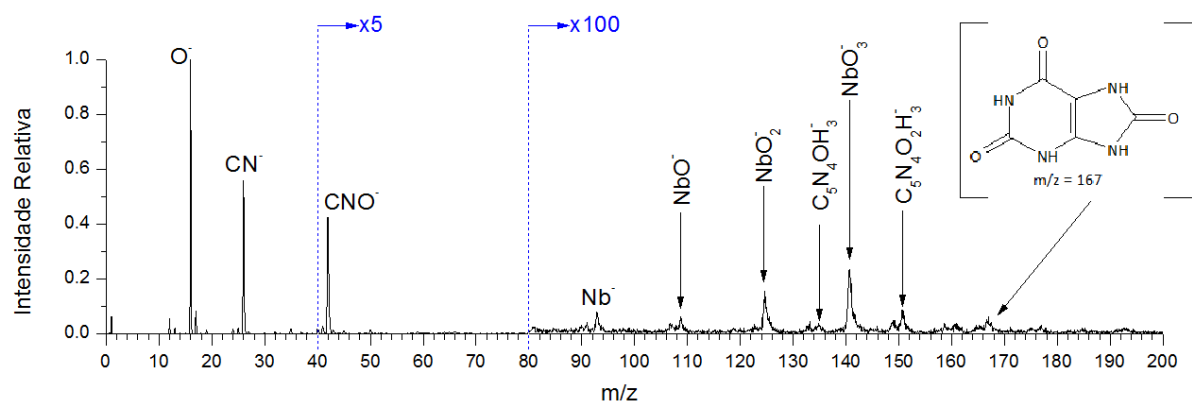


Fig. 6.21 Espectro de massa íões negativos do ácido úrico comprimido sobre nióbio.

Mais uma vez se verifica que os óxidos do nióbio são relativamente intensos no espectro (Fig. 6.21), mas ainda assim é possível identificar os picos característicos do ácido úrico.

Como aconteceu nos espectros negativos da HAp, também aqui se verifica que a afinidade electrónica baixa por parte do tântalo promove o aumento da intensidade relativa do oxigénio, e a diminuição das intensidades das outras espécies iónicas (que são as que se pretendem analisar). Este comportamento é facilmente visível através da comparação entre os espectros da Fig. 6.21 e da Fig. 6.22 (que têm a mesma ampliação).

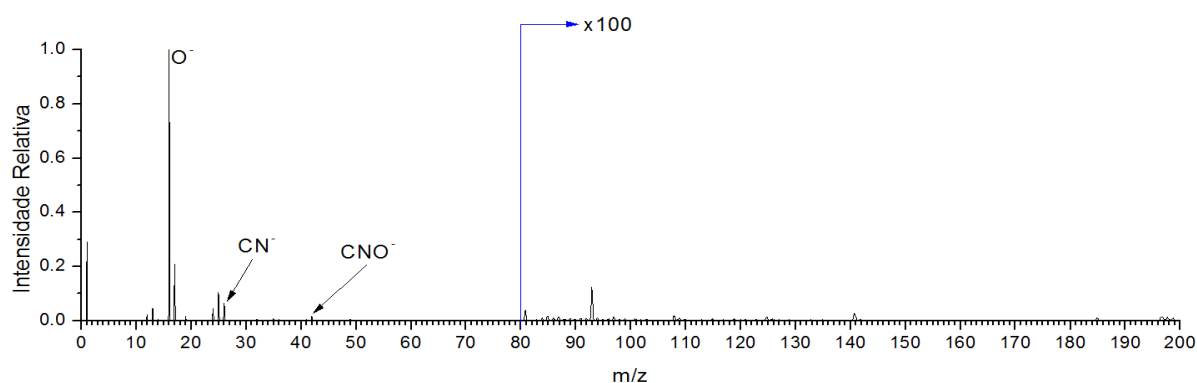


Fig. 6.22 Espectro massa de íões negativos da suspensão de ácido úrico sobre Ta

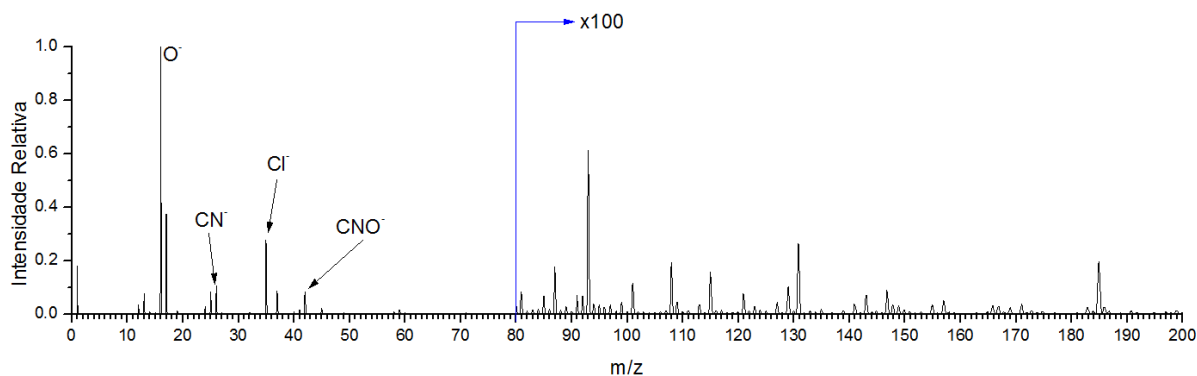


Fig. 6.23 Espectro de massa de íons negativos de ácido úrico sobre In

Para o índio, as intensidades das espécies que não o oxigénio foram mais elevadas do que no caso do tântalo, muito provavelmente devido à presença de cloro como contaminante, como já foi explicado no subcapítulo 6.1.2.1.

Para este estudo foi utilizado o seguinte número de espectros para cada tipo de preparação:

Tabela 6.4 Número de espectros utilizado para cada preparação diferente

Preparação	Número de espectros
Pó comprimido sobre Nb (i)	9
Pó comprimido sobre Nb (ii)	8
Pó comprimido sobre Ta (i)	9
Pó comprimido sobre Ta (ii)	9
Suspensão aquosa sobre Nb (i)	6
Suspensão aquosa sobre Nb (ii)	9
Suspensão aquosa sobre Ta (i)	9
Suspensão aquosa sobre Ta (ii)	9
Pó comprimido sobre In	4

6.2.2.1. Pulverização total

Como nos casos anteriores, foi calculado o número total de contagens de cada espectro obtido, de 0 u a 250 u. Depois foi calculada a média do número de contagens, para cada preparação diferente. O resultado encontra-se representado no gráfico da Fig. 6.24.

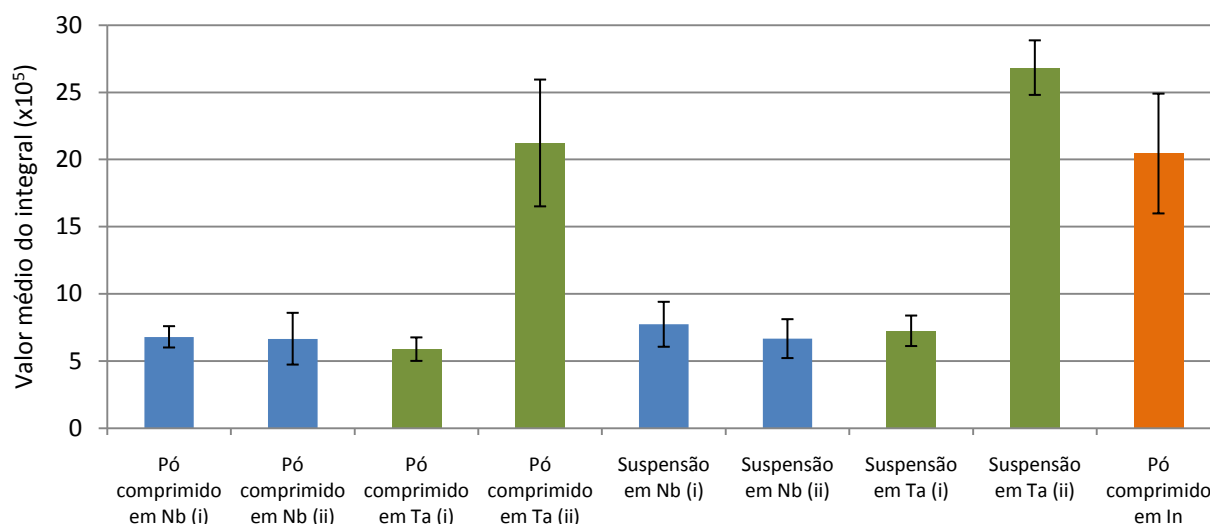


Fig. 6.24 Gráfico que representa a pulverização total do ácido úrico sobre o nióbio e o tântalo. A azul estão as amostras cujo substrato foi o nióbio, e a verde o tântalo.

Entre as amostras de nióbio, a pulverização total não variou significativamente de amostra para amostra, mesmo entre o tipo de preparação. No caso do tântalo verifica-se que na segunda amostra de cada preparação, o integral dos espectros superior em mais do dobro relativamente ao anterior. Para todos eles, as condições de operação do ToF-SIMS foram semelhantes, bem como o tempo de aquisição. O que se passou foi que as amostras preparadas continham menos quantidade de pó de ácido úrico (não condutor), e portanto o metal (que é condutor) estava mais exposto, provocando um maior número de íões secundários extraídos.

Relativamente à pulverização total do índio, esta é superior às das restantes amostras (sem contar com as amostras de tântalo com o comportamento anormal já referido), e este efeito está provavelmente relacionado com a função de trabalho. Na Tabela 4.1 o índio apresenta a função de trabalho mais baixa, o que potencia a pulverização de íões secundários negativos.

6.2.2.2. Comparação de picos característicos

Os picos utilizados para fazer o estudo comparativo da sua intensidade foram os dos íões CN^- (26), CNO^- (42), $\text{C}_5\text{N}_4\text{OH}_3^-$ (135), $\text{C}_5\text{N}_4\text{O}_2\text{H}_3^-$ (151), e a molécula de ácido úrico sem um dos hidrogénios ($\text{C}_5\text{N}_4\text{O}_3\text{H}_3^-$, 167). Foram calculadas as suas intensidades relativas (à soma total dos picos de massa de 0 a 250) de todos os espectros, e foi feita a sua média para cada amostra. Os resultados encontram-se nos gráficos das Fig. 6.25 e Fig. 6.26.

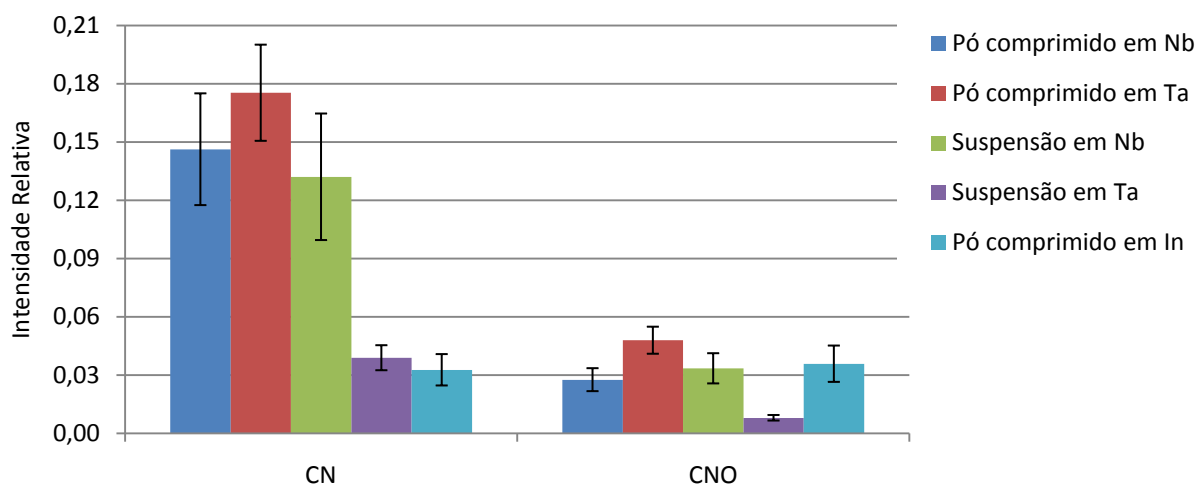


Fig. 6.25 Média das intensidades relativas dos íões CN^- e CNO^- para as diferentes preparações

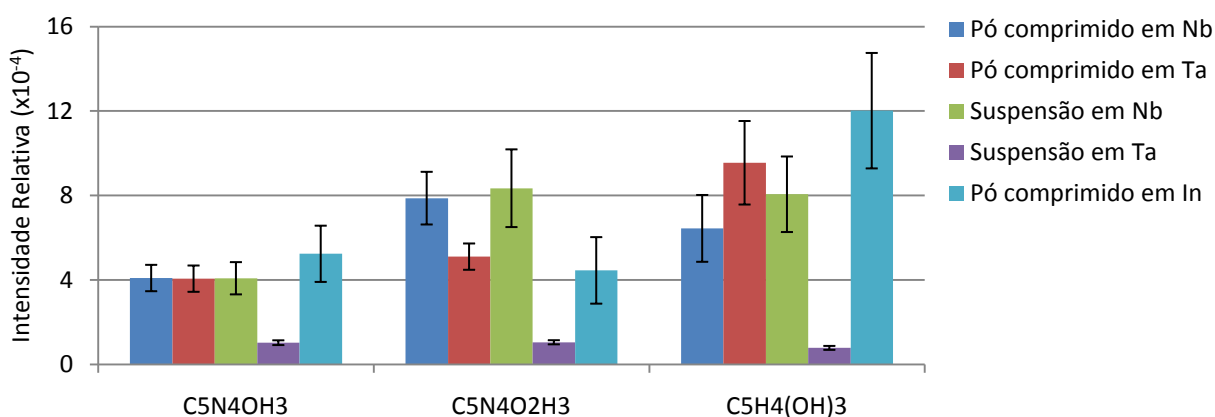


Fig. 6.26 Média das intensidades relativas dos íões $\text{C}_5\text{N}_4\text{OH}_3^-$, $\text{C}_5\text{N}_4\text{O}_2\text{H}_3^-$ e $\text{C}_5\text{H}_4\text{O}_3\text{H}_3^-$, para as diferentes preparações

Os gráficos das figuras anteriores revelam que, no geral, as amostras de suspensão aquosa sobre tântalo apresentaram menor intensidade relativa para os íões estudados, devido às razões já apresentadas sobre a afinidade electrónica. As restantes amostras apresentaram um comportamento semelhante (à excepção do índio para o íão cianeto).

CAPÍTULO 7

CONCLUSÃO

Neste trabalho foram testados dois metais diferentes para substrato de amostras biológicas, nomeadamente cálculos renais, sendo eles o tântalo e o nióbio. Os espectros obtidos foram depois comparados com os espectros das amostras com índio como substrato, que tinha vindo a ser usado até então.

O Nb e o Ta mostraram-se fáceis de manusear durante a preparação das amostras e compatíveis com a análise do vácuo. Foram também experimentados dois tipos de preparação diferentes no que toca à deposição dos pós do analito sobre o substrato: comprimindo-o ou depositando suspensão aquosa do pó sobre o metal.

Na análise da hidroxiapatite verificou-se que a proporção de iões desta, relativamente aos iões do metal varia. Se for usado o índio para os espectros positivos, devido às suas propriedades nomeadamente o potencial de ionização e a função de trabalho, este apresenta um pico muito intenso, e os iões associados à HAp (nomeadamente o cálcio) têm menor número de contagens no espectro de massa. O mesmo já não acontece para o nióbio e o tântalo, que têm potenciais de ionização mais elevados, o que leva à diminuição da pulverização das partículas do metal e ao aumento a pulverização de iões da hidroxiapatite. Assim, para adquirir espectros positivos da hidroxiapatite ou de outro composto rico em cálcio, é preferível usar Nb ou Ta, em vez de In como substrato metálico.

Para a aquisição de espectros negativos da HAp, o que se observou foi que para as amostras em que se usou tântalo, devido à baixa afinidade electrónica deste, a intensidade relativa do oxigénio foi mais elevada, promovendo a diminuição do número de contagens das espécies iónicas associadas à hidroxiapatite. Este fenómeno foi ainda mais visível para amostras preparadas com suspensão aquosa, uma vez que desta forma o metal estava mais “visível” ao feixe primário.

Na análise do ácido úrico, nos espectros positivos das amostras com índio, este metal não apresentou uma intensidade elevada como aconteceu na HAp, devido à presença de sódio na

amostra. Nos espectros negativos, o comportamento deveria ter sido semelhante entre as amostras com índio e com tântalo, porque estes dois metais têm valores de afinidade electrónica e função de trabalho relativamente próximos, mas tal não aconteceu devido à presença de cloro como contaminante.

Relativamente às proporções entre a intensidade relativa dos íões principais dos espectros dos compostos analisados, não se verificaram diferenças significativas entre as preparações, nem para a HAp nem para o ácido úrico.

Desta forma, apesar de o nióbio e o tântalo terem propriedades físicas próximas como a função de trabalho ou a taxa de pulverização de íões secundários, apresentam um comportamento diferente no que diz respeito à influência sobre a análise de compostos como a hidroxiapatite e o ácido úrico, nomeadamente para os espectros negativos. Conclui-se ainda que não é aconselhável o uso de tântalo como substrato para a aquisição de espectros de massa de íões negativos. Também não se deve usar o índio para a obtenção de espectros positivos, quando os compostos a estudar contiverem elementos com potenciais de ionização inferiores aos do próprio índio, por exemplo o cálcio. É ainda de evidenciar que com estes métodos de preparação, foi possível obter espectros com a informação necessária à identificação da HAp e do ácido úrico, sem ser necessária compensação de carga, e com tempo de aquisição relativamente baixo.

Foram estabelecidas relações entre as intensidades dos picos de massa das diferentes espécies nos espectros, e as propriedades físicas dos elementos (função de trabalho, potencial de ionização e afinidade electrónica). Para isso, considerou-se que estas propriedades se mantêm constantes, ou pelo menos com a mesma proporção entre elas, relativamente ao valor que têm no estado puro.

Este trabalho de dissertação de mestrado permitiu não só a aprendizagem e experiência acerca da análise de superfícies e das propriedades dos materiais, bem como de tudo o que envolve a técnica do ToF-SIMS, desde o complexo sistema de ultra alto vácuo à utilização de feixes de íões.

7.1. PERSPECTIVAS FUTURAS

Uma vez analisadas as formas de preparação das amostras biológicas, deve-se encaminhar a investigação nesta área no sentido de aproveitar todas as potencialidades que o ToF-SIMS possui. É o caso da imagem química, para a localização e estudo das diferentes espécies químicas no cálculo, nomeadamente no centro do mesmo, porque é no centro que se inicia a sua formação.

Por outro lado, seria interessante também investigar formas para facilitar a análise dos espectros dos cálculos renais, uma vez que estes são constituídos por uma mistura de compostos que produzem um espectro complexo e, por vezes, de difícil análise e identificação das espécies presentes. É de destacar o PCA, *Principal Component Analysis*, um método matemático que transforma um grande número de variáveis correlacionadas num pequeno número de variáveis não correlacionadas (ortogonais), chamadas de componentes principais (30). Neste caso, este grande número de variáveis corresponderia às intensidades dos picos de um espectro que seriam tratadas matematicamente, de forma a reduzir a quantidade de informação e facilitar a análise.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **C. Amjad A. Ghumman, Olga M. T. Carreira, Augusto M. C. Moutinho, Alexander Tolstogousov, Valentina Vassilenko, Orlando M. N. D. Teodoro.** Identification of human calculi with time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 24: 185-190, 2009.
2. **J. Kaloustian, A. M. Pauli, G. Pieroni, H. Portugal.** The use of thermal analysis in determination of some urinary calculi of calcium oxalate. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2002, Vols. 70: 959–973.
3. **Trinchieri, Alberto.** Epidemiology of urolithiasis: an update. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*. 5(2): 101-106, 2008.
4. **Brian R Matlaga, Ojas D Shah, Dean G Assimios.** Drug-Induced Urinary Calculi. *MedReviews*. 5(4): 227–231, 2003, Reviews in Urology.
5. **Lancina Martín JA, Vila Passols R, Lázaro Castillo J, Grases Freixedas F, Arrabal Martín M.** Analysis of calculi in the era of extracorporeal lithotripsy. (13th National Meeting of Urolithiasis and Urinary Endoscopy). *Mesa Redonda - Actas Urológicas Españolas*. 2001.
6. **Carvalho, David.** Nefrologia - Cada vez mais pessoas com cálculos renais. *Medicina & Saúde*. 106, 2006.
7. **Marcel Volmer, Jules C.M. de Vries, Henk M.J. Goldschmidt.** Infrared Analysis of Urinary Calculi by a Single Reflection Accessory and a Neural Network Interpretation Algorithm. *Clinical Chemistry*. 47:7, 1287–1296, 2001, Automation and Analytical Techniques.
8. **Jennifer C. Anderson, James C. Williams Jr, Andrew P. Evan, Keith W. Condon, André J. Sommer.** Analysis of urinary calculi using an infrared microspectroscopic surface reflectance imaging technique. *Urol Res*. 35:41–48, 2007.
9. **A.I. Ancharova, A.I. Nizovskiib, S.A. Gridnev, I.V. Feofilovd, A.N. Vichkanov.** An attempt of in vivo X-ray diffraction analysis of kidney stones with the use of synchrotron radiation. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*. 543: 302–305, 2005.
10. **B.A. Keller, P. Hug.** Time-of-Flight secondary ion mass spectrometry of industrial materials. *Analytica Chimica Acta*. 393, 201-212, 1999.
11. **Tammy M. Mililloa, Joseph A. Gardella, Jr.** Spatial statistics and interpolation methods for TOF SIMS imaging. *Applied Surface Science*. 252: 6883-6890, 2006, 19.

12. **Anna M. Belu, Daniel J. Graham, David G. Castner.** Time-of-flight secondary ion mass spectrometry: techniques and applications for the characterization of biomaterial surfaces. *Biomaterials*. 24: 3635–3653, 2003.
13. **Murray J. Favus, M.D.** Chapter 14. Nephrolithiasis . [Online] [Citação: 1 de Setembro de 2010.] <http://www.endotext.org/parathyroid/parathyroid14/index.html>.
14. **Subhash Chandra, George H Morrison.** Sample preparation of animal tissues and cell cultures for secondary ion mass spectrometry (SIMS) microscopy. *Bio Cell*. 74: 31-42, 1992.
15. Niobium - Wikipedia, the free encyclopedia. [Online] [Citação: 12 de Outubro de 2010.] <http://en.wikipedia.org/wiki/Niobium>.
16. *Tantalum* - Wikipedia, the free encyclopedia. [Online] [Citação: 12 de Outubro de 2010.] <http://en.wikipedia.org/wiki/Tantalum>.
17. **Laboratory, National Physical.** Chapter: 4 Atomic and nuclear physics, Section: 4.3 Work function. *Kaye and Laby, tables of physical and chemical constants*. [Online] 2008. [Citação: 2 de Setembro de 2010.] http://www.kayelaby.npl.co.uk/atomic_and_nuclear_physics/4_3/4_3.html.
18. **Efstathiou, Prof. C. E.** Periodic table. [Online] [Citação: 11 de June de 2010.] http://www.chem.uoa.gr/Applets/AppletPerTable/Appl_PerTable2.html.
19. **Yong-wen Tan, Yu-min Song, Peng Zhou, Cheng-yu Wang, Hai Yang.** Monte Carlo simulation for the sputtering yield of Si₃N₄ thin film milled by focused ion beams. *Optoelectronics Letters*. 2008, Vols. 4, no. 4.
20. **Anna M. Belu, Daniel J. Graham, David G. Castner.** Time-of-flight secondary ion mass spectrometry: techniques and applications for the characterization of biomaterial surfaces. *Biomaterials*. 24: 3635–3653, 2003.
21. **Balamurugan, A. K.** [Online] [Citação: 12 de Setembro de 2010.] <http://akbmurugan.com/downloads>.
22. **Teodoro, O.M.N.D.** *Observando Superfícies*. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa : Tese de Doutoramento, 1998.
23. Ionization potentials 4.1.2. *National Physical Laboratory*. [Online] 2008. [Citação: 30 de Outubro de 2010.] http://www.kayelaby.npl.co.uk/atomic_and_nuclear_physics/4_1/4_1_2.html.

24. Electron Affinity. [Online] [Citação: 30 de Outubro de 2010.] <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/chemical/eleaff.html>.
25. **Robert G. Wilson, Fred A. Stevie, Charles W. Magee.** *Secondary Ion Mass Spectrometry, A Practical Handbook for Depth Profiling and Bulk Impurity Analysis*. s.l. : Wiley Interscience, 1989.
26. Hydroxylapatite, for analysis . *Acros Organics*. [Online] [Citação: 3 de Setembro de 2010.] http://www.acros.be/DesktopModules/Acros_Search_Results/Acros_Search_Results.aspx?search_type=CatalogSearch&SearchString=hydroxylapatite.
27. *Acros Organics. Uric acid, 99+% .* [Online] [Citação: 3 de Setembro de 2010.] http://www.acros.be/DesktopModules/Acros_Search_Results/Acros_Search_Results.aspx?search_type=CatalogSearch&SearchString=uric%20acid.
28. *Piranha solution - Wikipedia, the free encyclopedia.* [Online] [Citação: 20 de Outubro de 2010.] http://en.wikipedia.org/wiki/Piranha_solution.
29. **Serviço de Bioestatística e Informática Médica, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.** *Erro Padrão.* [Online] [Citação: 24 de Setembro de 2010.] <http://stat2.med.up.pt/cursop/glossario/epadrao.html>.
30. **Hongbo B. Lu, Charles T. Campbell, Daniel J. Graham, Buddy D. Ratner.** Surface Characterization of Hydroxyapatite and Related Calcium Phosphates by XPS and TOF-SIMS. *Analytical Chemistry*. 72: 2886-2894, 200, Vol. 20.